



HAL
open science

L'activation de la voie du GMP cyclique réduit le comportement d'auto-administration de cocaïne chez le rat : implication de régulations épigénétiques

Élodie Deschatrettes

► To cite this version:

Élodie Deschatrettes. L'activation de la voie du GMP cyclique réduit le comportement d'auto-administration de cocaïne chez le rat : implication de régulations épigénétiques. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Strasbourg, 2012. Français. NNT : 2012STRAJ134 . tel-00937526

HAL Id: tel-00937526

<https://theses.hal.science/tel-00937526>

Submitted on 28 Jan 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.

ÉCOLE DOCTORALE VIE ET SANTÉ

FRE3289 Laboratoire d'Imagerie et de Neurosciences Cognitives

THÈSE présentée par :
Élodie DESCHATRETTES

soutenue le : **26 septembre 2012**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : **Neurosciences**

**L'activation de la voie du GMP cyclique
réduit le comportement d'auto-
administration de cocaïne chez le rat.
Implication de régulations épigénétiques.**

THÈSE dirigée par :
ZWILLER Jean

Docteur, université de Strasbourg

RAPPORTEURS :
NAASSILA Mickaël
THIRIET Nathalie
LUGNIER Claire

Professeur, université de Picardie Jules Verne
Docteur, université de Poitiers
Docteur, université de Strasbourg



Université de Strasbourg
Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

THESE

présentée par

Elodie DESCHATRETTES

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

L'activation de la voie du GMP cyclique réduit le
comportement d'auto-administration de cocaïne chez le rat.
Implication de régulations épigénétiques.

Soutenue le 26 septembre 2012 devant le jury d'examen :

| | | |
|---------------------|------------------------------------|--------------------|
| Pr Mickaël NAASSILA | Université de Picardie Jules Verne | Rapporteur externe |
| Dr Nathalie THIRIET | Université de Poitiers | Rapporteur externe |
| Dr Claire LUGNIER | Université de Strasbourg | Rapporteur interne |
| Dr Jean ZWILLER | Université de Strasbourg | Directeur de thèse |

Résumé

Les effets à long terme des drogues, dont la dépendance, sont dus à des neuroadaptations qui se mettent en place dans le système nerveux central suite à une exposition répétée à ces substances. Malgré de nombreuses avancées, ces mécanismes restent à ce jour mal compris, et de nouvelles pistes restent à trouver pour mieux appréhender les modulations comportementales induites par les drogues.

Nous avons étudié l'influence de la voie de la guanosine monophosphate 3'-5' cyclique (cGMP) sur le comportement d'auto-administration de cocaïne chez le rat. Nous avons montré que trois activateurs différents de cette voie, le 8-bromo-cGMP (Br-cG) qui active directement la protéine kinase dépendante du cGMP (PKG), le peptide natriurétique de type C (CNP) qui active son récepteur GC-B à activité guanylate cyclasique, et le zaprinast, un inhibiteur de la phosphodiesterase PDE5, réduisent le nombre d'injections que les rats déclenchent, à la fois dans un protocole de ratio fixe, ce qui traduit une diminution de l'effet renforçant de la cocaïne, et dans un protocole de ratio progressif, ce qui indique une diminution de la motivation de l'animal pour la drogue. L'effet a été observé après injection des produits dans le cortex préfrontal médian (CPFm), mais pas dans d'autres structures dopaminergiques.

Des études immunohistochimiques nous ont permis de mettre en évidence que la réduction du comportement d'auto-administration était accompagnée d'une diminution de l'expression des marqueurs épigénétiques MeCP2 (methyl-CpG binding protein 2) et HDAC2 (histone désacétylase 2), ainsi que d'une augmentation des niveaux d'acétylation des histones H3 et H4. Un ensemble de données de l'équipe montre que l'auto-administration de cocaïne est sous le contrôle étroit de mécanismes épigénétiques, et nos résultats confortent cette hypothèse de travail. Dans une série d'expériences complémentaires, nous avons démontré que la surexpression de la PKG et/ou son activation par le Br-cG réduisent l'expression de MeCP2 et de HDAC2, et ce de manière plus importante en présence de cocaïne. Ces données indiquent ainsi que la voie du cGMP, et en particulier la PKG, est en mesure de réguler des protéines impliquées dans les mécanismes épigénétiques.

Nos résultats montrent l'efficacité des modulations de la voie du cGMP dans le CPFm sur le comportement d'auto-administration de cocaïne chez le rat. La découverte d'une action *via* des protéines impliquées dans les régulations épigénétiques – et notamment dans les deux processus complémentaires que sont méthylation de l'ADN et acétylation des histones – nous permet de suggérer des pistes originales et nouvelles quant aux mécanismes mis en jeu dans la diminution des propriétés renforçantes de la cocaïne.

Abstract

Long-term effects of drugs, including dependence, arise from neuroadaptive mechanisms in the central nervous system after repeated exposure. Although substantial progress has been made, these mechanisms remain allusive, and new leads have to be explored in order to better understand the behavioral modulations induced by these substances.

We studied the influence of the 3'-5' cyclic guanosine monophosphate (cGMP) pathway on cocaine self-administration by rats. We showed that three activators of this pathway reduced the number of self-injections triggered by rats: 8-bromo-cGMP (Br-cG), a cell-permeant cGMP analog that directly activates the cGMP-dependent protein kinase (PKG), the C-type natriuretic peptide CNP that stimulates cGMP synthesis through its receptor GC-B (guanylyl cyclase B), and zaprinast, a phosphodiesterase 5 (PDE5) inhibitor. The effects of these treatments were observed both under a fixed ratio schedule of reinforcement, which suggests a reduction of the reinforcing properties of cocaine, and under a progressive ratio schedule, which implies a lesser motivation of the animal for the drug. Treatments showed an effect when performed into the medial prefrontal cortex (mPFC), but not when performed into other dopaminergic structures.

Immunohistochemical studies revealed that the same rats that reduced their number of self-injections after cGMP-elevating treatments also showed a reduced expression of the epigenetic markers MeCP2 (methyl-CpG binding protein 2) and HDAC2 (histone deacetylase 2), as well as increased levels of histones H3 and H4 acetylation. Studies from our laboratory already showed that cocaine self-administration was controlled by such epigenetic mechanisms; the results we present here confirm this working assumption. In a complementary study, we demonstrated that PKG overexpression or its activation by Br-cG reduced MeCP2 and HDAC2 expression, an effect that was amplified when rats were treated with cocaine. This indicates that the cGMP pathway, and especially PKG, is able to regulate proteins implied in epigenetic mechanisms.

Our results show the influence of intra-mPFC modulations of the cGMP pathway on cocaine self-administration by rats. The uncovering of the implication of epigenetic regulations – especially DNA methylation and histone acetylation, two processes closely intertwined – leads us to suggest original hypotheses about the processes underlying the reduction of the reinforcing properties of cocaine.

Communications

Publications présentées dans ce mémoire

Deschatrettes, E., Romieu, P., Zwiller, J. Overexpression of cyclic GMP-dependent protein kinase reduces MeCP2 and HDAC2 expression. Article soumis pour publication.

Deschatrettes, E., Romieu, P., Zwiller, J. Cocaine self-administration by rats is inhibited by cyclic GMP-elevating agents. Involvement of epigenetic markers. Article soumis pour publication.

NOTE : Ces deux articles ont été acceptés pour publication peu de temps après la soutenance du mémoire. Les références sont jointes p.67 et p.103 respectivement.

Autres publications

Romieu, P., **Deschatrettes, E.**, Host, L., Gobaille, S., Sandner, G., Zwiller, J. (2011) The inhibition of histone deacetylases reduces the reinstatement of cocaine-seeking behavior in rats, *Curr Neuropharmacol*, 9:21-25.

Communications affichées

Deschatrettes, E., Romieu, P., Host, L., Zwiller, J., The cGMP/PKG pathway modulates cocaine self-administration in rats ; Neurex annual meeting, Strasbourg, juin 2009.

Deschatrettes, E., Romieu, P., Host, L., Zwiller, J., The cGMP/PKG pathway modulates cocaine self-administration in rats ; 7th FENS Forum of European Neurosciences, Amsterdam, Pays-Bas, juillet 2010.

Deschatrettes, E., Romieu, P., Zwiller, J., Activators of the cGMP/PKG pathway modulate cocaine self-administration in rats : involvement of the epigenetic parameters MeCP2 and histone acetylation ; 10^{ème} Colloque de la Société des Neurosciences, Marseille, mai 2011.

Remerciements

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé au sein de l'équipe « Psychostimulants et processus neuroadaptatifs » dirigée par Jean Zwiller. Je remercie Christian Kelche, directeur du LINC (Laboratoire d'Imagerie et de Neurosciences Cognitives) pour son accueil au sein de cette unité chaleureuse. Je remercie les membres du jury d'avoir accepté de juger mon travail.

J'adresse d'immenses remerciements à Jean, pour m'avoir accueillie dans son équipe et pour avoir accepté de diriger ce travail de thèse. Merci pour ton enthousiasme scientifique contagieux, pour la grande patience dont tu as fait preuve à mon égard, et pour ta disponibilité inépuisable, même tard, et même quand tu avais beaucoup trop de travail par ailleurs.

Je remercie énormément Pascal Romieu, qui m'a (presque) tout appris du point de vue technique. Merci d'avoir été à l'écoute et toujours attentif à mes humeurs, bonnes ou mauvaises, et merci pour les discussions scientifiques (et autres). Je salue tous les membres de notre équipe, jamais avares de quelques minutes pour discuter de tout et de rien ou pour donner un avis technique parfois décisif ; un merci en particulier à Marie-Odile Revel pour son aide technique.

Mon travail de thèse aurait été beaucoup plus compliqué et beaucoup moins agréable sans la présence des doctorants de l'équipe : Lionel Host d'abord, qui m'a encadrée dans mes débuts, Delphine Carouge, dont l'expérience de fin de thèse m'a aidée à démarrer, Mathieu Fonteneau, auquel j'ai pris plaisir à transmettre un peu de mon expérience, et Sarah Pol Bodetto surtout, toujours à fleur de peau par rapport au travail, toujours motivée pour organiser un repas, une soirée, une conférence de vulgarisation... Je remercie également Carolina Tesone, pour ses précieux conseils et sa bonne humeur.

Je remercie les autres doctorants, en particulier ceux du LINC Esplanade, d'avoir rendu les dernières années de ma thèse aussi fun. Je garderai le souvenir d'un laboratoire où l'émulation et la rigueur scientifiques se combinent à l'humour (plus ou moins fin) et à la chaleur humaine. Merci aux autres, anciens du master ou issus d'autres équipes. J'ai apprécié la cohésion des doctorants des neurosciences strasbourgeoises.

J'adresse un merci particulier à Arielle Ferrandon d'avoir pris le temps de me remonter le moral, de me montrer quelques techniques, voire de préparer quelques solutions. Merci aussi à Serge Gobaille pour son expertise.

Enfin, je remercie mes proches et ma famille de m'avoir soutenue tout au long de cette thèse. Merci à mes parents de nous avoir transmis l'envie d'apprendre et d'avoir favorisé notre esprit critique. Merci à Alice de m'avoir toujours montré que j'avais le choix ; merci à Simon et Manu

pour leurs commentaires sarcastiques et leur tolérance à mes plaintes. Et bien sûr un immense merci à Chie, Louise et Sébastien de m'avoir tant dépannée dans la dernière ligne droite des ultimes manips et de la rédaction. Je ne nomme pas les autres, mais ils savent qui ils sont.

Je dédie ce mémoire à Joël, que je remercie pour tout ça et bien plus encore, et à Camille qui, du haut de ses quelques mois, me rappelle tous les jours ce qui est important et ce qui l'est moins. Rappelle-toi que ta maman a aussi été une neuroscientifique.

Sommaire

Table des matières

| | |
|---|----|
| <u>Introduction générale</u> | 1 |
| <u>Contexte scientifique</u> | 3 |
| <u>Partie I : Cocaïne et cerveau</u> | 3 |
| <u>A - La cocaïne</u> | 3 |
| <u>A-1 Caractéristiques et usages</u> | 3 |
| <u>A-2 Effets de la prise aiguë de cocaïne</u> | 4 |
| <u>A-3 Effets d'un usage chronique de cocaïne</u> | 4 |
| <u>A-4 Pharmacocinétique et catabolisme de la cocaïne</u> | 5 |
| <u>B - Neurotransmissions modulées par la cocaïne</u> | 7 |
| <u>B-1 La dopamine</u> | 7 |
| <u>B-1-1 Les voies dopaminergiques</u> | 7 |
| a) <u>La voie nigrostriée</u> | 8 |
| b) <u>La voie mésocorticolimbique</u> | 8 |
| <u>B-1-2 La synapse dopaminergique</u> | 9 |
| a) <u>Cycle synaptique de la dopamine</u> | 9 |
| b) <u>Les récepteurs de la dopamine</u> | 9 |
| c) <u>Les transporteurs de la dopamine</u> | 11 |
| d) <u>Voies de régulation de la neurotransmission dopaminergique</u> | 12 |
| e) <u>Effet de la cocaïne sur la neurotransmission dopaminergique</u> | 12 |
| <u>B-2 La sérotonine</u> | 14 |
| <u>B-2-1 Les voies sérotoninergiques</u> | 14 |
| <u>B-2-2 La synapse sérotoninergique</u> | 15 |
| <u>B-2-3 Implication dans l'action de la cocaïne</u> | 16 |
| <u>B-3 La noradrénaline</u> | 16 |
| <u>B-3-2 Les voies noradrénergiques</u> | 16 |
| <u>B-3-2 La synapse noradrénergique</u> | 17 |
| <u>B-3-3 Implication dans l'action de la cocaïne</u> | 17 |
| <u>B-4 Autres neurotransmissions</u> | 17 |
| <u>B-4-1 Le GABA</u> | 17 |
| a) <u>Le système GABAergique</u> | 17 |

| | |
|--|----|
| b) <u>Implication dans l'action de la cocaïne</u> | 18 |
| <u>B-4-2 Le glutamate</u> | 18 |
| a) <u>Le système glutamatergique</u> | 18 |
| b) <u>Implication dans l'action de la cocaïne</u> | 19 |
| <u>B-4-3 Les endocannabinoïdes</u> | 19 |
| <u>B-4-4 Les opiacés endogènes</u> | 20 |
| <u>C - Le système de récompense</u> | 21 |
| <u>C-1 Définition</u> | 21 |
| <u>C-2 Les structures du système de récompense</u> | 21 |
| <u>C-2-1 Aire tegmentale ventrale</u> | 21 |
| <u>C-2-2 Noyau accumbens</u> | 22 |
| <u>C-2-3 Cortex préfrontal</u> | 22 |
| <u>C-2-4 L'amygdale</u> | 23 |
| <u>D - La dépendance aux drogues</u> | 24 |
| <u>D-1 Définition, épidémiologie</u> | 24 |
| <u>D-1-1 Généralités</u> | 24 |
| <u>D-1-2 Critères du diagnostic</u> | 24 |
| <u>D-2 Neurobiologie de la dépendance</u> | 25 |
| <u>D-2-1 Théories de la dépendance</u> | 25 |
| a) <u>Renforcements positif et négatif</u> | 26 |
| b) <u>Dérégulation homéostatique</u> | 26 |
| c) <u>Apprentissage procédural lié aux drogues</u> | 26 |
| d) <u>« Incentive sensitization » ou sensibilisation motivationnelle</u> | 27 |
| <u>D-2-2 Autres apports théoriques</u> | 27 |
| a) <u>Dysfonctionnement fronto-striatal</u> | 27 |
| b) <u>Modifications de la plasticité synaptique</u> | 28 |
| <u>D-3 Approches thérapeutiques</u> | 28 |
| <u>E - L'auto-administration de drogues chez le rongeur</u> | 31 |
| <u>E-1 Les modèles animaux dans l'étude des drogues</u> | 31 |
| <u>E-1-1 Activité locomotrice et sensibilisation comportementale</u> | 31 |
| <u>E-1-2 Préférence de place conditionnée</u> | 31 |
| <u>E-2 L'auto-administration intraveineuse de cocaïne</u> | 32 |

| | |
|--|----|
| <u>Partie II : Les régulations épigénétiques</u> | 34 |
| <u>A - Définitions</u> | 34 |
| <u>B - La chromatine et ses modifications</u> | 35 |
| <u>B-1 Organisation de la chromatine</u> | 35 |
| <u>B-2 Histones et nucléosomes</u> | 36 |
| <u>B-3 La méthylation de l'ADN</u> | 37 |
| <u>B-3-1 Mécanismes</u> | 37 |
| <u>B-3-2 Les protéines de liaison à l'ADN méthylé</u> | 39 |
| <u>B-4 Les modifications post-traductionnelles des histones</u> | 40 |
| <u>B-4-1 Acétylation</u> | 41 |
| <u>a) Mécanisme</u> | 41 |
| <u>b) Les histone acétyltransférases</u> | 42 |
| <u>c) Les histone désacétylases</u> | 43 |
| <u>B-4-2 Méthylation</u> | 44 |
| <u>B-4-3 Phosphorylation</u> | 45 |
| <u>C - Implications fonctionnelles des mécanismes épigénétiques dans le cerveau</u> | 46 |
| <u>C-1 Epigénétique, influence de l'environnement et plasticité neuronale</u> | 46 |
| <u>C-2 Modifications épigénétiques et mode d'action des drogues</u> | 48 |
| <u>Partie III : La voie du GMP cyclique</u> | 50 |
| <u>A - Le GMP cyclique</u> | 50 |
| <u>B - La synthèse du GMP cyclique</u> | 51 |
| <u>B-1 Les peptides natriurétiques et leurs récepteurs à activité guanylate cyclasique</u> | 51 |
| <u>B-1-1 La famille des peptides natriurétiques</u> | 51 |
| <u>B-1-2 Les récepteurs des peptides natriurétiques</u> | 52 |
| <u>B-1-3 Localisation et fonctions des peptides natriurétiques et de leurs récepteurs</u> | 54 |
| <u>a) Effets somatiques</u> | 54 |
| <u>b) Action sur le système nerveux</u> | 54 |
| <u>B-2 Le monoxyde d'azote et la guanylate cyclase soluble</u> | 56 |
| <u>B-2-1 Caractérisation</u> | 56 |
| <u>B-2-2 Fonctions</u> | 56 |
| <u>C - Les cibles du GMP cyclique</u> | 58 |

| | |
|--|-----|
| <u>C-1 Les protéine kinases dépendantes du GMP cyclique</u> | 58 |
| <u>C-1-1 Caractérisation et localisation</u> | 58 |
| <u>C-1-2 Substrats des PKG, fonctions</u> | 59 |
| <u>C-2 Les phosphodiesterases des nucléotides cycliques</u> | 60 |
| <u>C-2-1 Caractérisation</u> | 60 |
| <u>C-2-2 Fonctions</u> | 61 |
| <u>C-3 Les canaux ioniques régulés par le cGMP</u> | 61 |
| <u>D - Régulations de la voie du GMP cyclique et implication dans le mode d'action des drogues</u> | 62 |
| <u>D-1 Régulations croisées des voies du cAMP et du cGMP</u> | 62 |
| <u>D-2 Compartimentation du signal cGMP</u> | 62 |
| <u>D-3 Voie du cGMP et mode d'action des drogues</u> | 63 |
| <u>Résultats</u> | 67 |
| <u>Publication 1</u> | |
| <u>Cocaine self-administration by rats is inhibited by cyclic GMP-elevating agents. Involvement of epigenetic markers</u> | 67 |
| <u>Résultats complémentaires</u> | 93 |
| <u>A - Validation du protocole expérimental</u> | 95 |
| <u>A-1 La chirurgie stéréotaxique ne modifie pas le comportement d'auto-administration des rats</u> | 95 |
| <u>A-2 L'activation de la voie du cGMP dans le CPFm ne modifie pas la discrimination envers l'orifice actif</u> | 96 |
| <u>B - Traitements pharmacologiques complémentaires dans le test d'auto-administration</u> | 97 |
| <u>B-1 L'injection de Br-cG dans l'amygdale basolatérale ne modifie pas le comportement d'auto-administration des rats</u> | 97 |
| <u>B-2 L'injection de Br-cG dans le CPFm ne modifie pas le comportement d'auto-administration des rats à une dose de cocaïne plus importante</u> | 98 |
| <u>B-3 Un traitement à la papavérine ne modifie le comportement d'auto-administration ni dans le protocole de FR1 ni dans un protocole de PR</u> | 100 |
| <u>B-4 La combinaison d'injections de Br-cG et de zaprinast dans le CPFm ne diminue pas le comportement des rats sous le protocole de FR1</u> | 101 |
| <u>C - Analyses immunohistochimiques</u> | 102 |

| | |
|--|-----|
| <u>Publication 2</u> | |
| <u>Overexpression of cyclic GMP-dependent protein kinase reduces MeCP2 and HDAC2 expression</u> | 103 |
| | |
| <u><i>Discussion générale</i></u> | 129 |
| <u>A - GMP cyclique et auto-administration de cocaïne</u> | 129 |
| <u>A-1 Effet d'activateurs de la voie du cGMP dans le protocole de FR1</u> | 129 |
| <u>A-1-1 Injections intracérébrales de Br-cG dans le protocole de FR1</u> | 130 |
| a) Spécificité de l'effet par rapport à la structure | 130 |
| b) Analyses complémentaires | 131 |
| <u>A-1-2 Injections de CNP et de zaprinast dans le protocole de FR1</u> | 132 |
| a) Injections de CNP dans le CPFm | 132 |
| b) Injections de zaprinast dans le CPFm | 132 |
| c) Injections systémiques de papavérine | 133 |
| <u>A-2 Analyse de l'effet obtenu en FR1</u> | 133 |
| <u>A-3 Activation de la voie du cGMP dans un protocole de PR</u> | 134 |
| <u>A-4 Mécanismes d'action du cGMP</u> | 135 |
| <u>B - GMP cyclique et régulations épigénétiques</u> | 136 |
| <u>B-1 La piste des régulations épigénétiques</u> | 136 |
| <u>B-2 Expression de marqueurs épigénétiques et auto-administration avec activation in situ de la voie du cGMP</u> | 137 |
| <u>B-3 Effet de la surexpression et de l'activation de la PKG sur les marqueurs épigénétiques</u> | 137 |
| <u>Conclusion générale</u> | 139 |
| | |
| <u><i>Précisions méthodologiques</i></u> | 141 |
| <u>A - Animaux et traitements pharmacologiques</u> | 141 |
| <u>A-1 Animaux</u> | 141 |
| <u>A-2 Composés pharmacologiques</u> | 141 |
| <u>A-3 Chirurgie stéréotaxique et injections intracérébrales</u> | 142 |
| <u>A-4 Traitements pharmacologiques aigus</u> | 143 |
| A-4-1 Transfert de gènes in vivo | 143 |
| A-4-2 Planning des injections | 143 |
| <u>B - Auto-administration intraveineuse de cocaïne</u> | 144 |

| | |
|---|-----|
| <u>B-1 Construction du cathéter intraveineux</u> | 144 |
| <u>B-2 Implantation du cathéter intraveineux</u> | 145 |
| <u>B-3 Appareillage d'auto-administration intraveineuse</u> | 146 |
| <u>B-4 Protocoles d'auto-administration</u> | 148 |
| <u>B-4-1 Ratio fixe</u> | 148 |
| <u>B-4-2 Ratio progressif</u> | 149 |
| <u>B-5 Analyse des données</u> | 151 |
| <u>C - Études immunohistochimiques</u> | 151 |
| <u>C-1 Perfusions intracardiaques et coupes</u> | 151 |
| <u>C-2 Protocole d'immunohistochimie</u> | 153 |
| <u>C-2-1 Anticorps</u> | 153 |
| <u>C-2-2 Marquage et révélation à la peroxydase</u> | 153 |
| <u>C-3 Analyse</u> | 154 |
| <u>Références bibliographiques</u> | 155 |

Table des illustrations

| | Figures |
|---|----------------|
| Figure 1 : Structure de la cocaïne..... | 3 |
| Figure 2 : Voies de dégradation de la cocaïne..... | 6 |
| Figure 3 : Structure de la dopamine..... | 7 |
| Figure 4 : Anatomie des voies dopaminergiques à fibres longues..... | 8 |
| Figure 5 : Métabolisme de la dopamine..... | 9 |
| Figure 6 : Action de la cocaïne sur la synapse dopaminergique..... | 13 |
| Figure 7 : Structure de la sérotonine..... | 14 |
| Figure 8 : Anatomie des voies sérotoninergiques..... | 14 |
| Figure 9 : Métabolisme de la sérotonine..... | 15 |
| Figure 10 : Structure de la noradrénaline..... | 16 |
| Figure 11 : États de compaction de la chromatine..... | 35 |
| Figure 12 : Structure tridimensionnelle du nucléosome..... | 36 |
| Figure 13 : Méthylation de l'ADN..... | 37 |
| Figure 14 : Répression de la transcription par la liaison de MeCP2 à l'ADN méthylé..... | 39 |
| Figure 15 : Acétylation des histones sur un résidu lysine..... | 42 |
| Figure 16 : Influence de l'environnement sur la structure de la chromatine..... | 46 |
| Figure 17 : Structure du GMP cyclique..... | 50 |
| Figure 18 : Voies de synthèse du GMP cyclique..... | 51 |
| Figure 19 : Structure des peptides natriurétiques humains..... | 52 |
| Figure 20 : Structure des récepteurs des peptides natriurétiques..... | 53 |
| Figure 21 : Exemple de compartimentation du GMP cyclique..... | 63 |
| Figure 22 : Contrôle de l'influence de la chirurgie stéréotaxique sur le comportement d'auto-administration des rats..... | 95 |
| Figure 23 : Part de nose pokes réalisés dans l'orifice actif sous le protocole de FR1..... | 96 |
| Figure 24 : Effet d'injections de Br-cG dans la BLA sous le protocole de FR1..... | 97 |
| Figure 25 : Courbe dose-réponse théorique de la cocaïne sous le protocole de FR1..... | 98 |

| | | |
|-------------|--|-----|
| Figure 26 : | Effet d'une dose de cocaïne plus forte sous le protocole de FR1..... | 99 |
| Figure 27 : | Injections i.p. de papavérine et auto-administration..... | 100 |
| Figure 28 : | Effet d'injections combinées de Br-cG et de zaprinast dans le CPFm sous le protocole de FR1..... | 101 |
| Figure 29 : | Quantification des cellules exprimant les formes phosphorylées de MeCP2 et de l'histone H3..... | 102 |
| Figure 30 : | Vérification de l'implantation des guide-canules..... | 143 |
| Figure 30 : | Surexpression / activation de la PKG..... | 144 |
| Figure 31 : | Cathéter intraveineux..... | 145 |
| Figure 32 : | Appareillage d'auto-administration intraveineuse..... | 147 |
| Figure 33 : | Déroulement de l'auto-administration sous le protocole de FR1..... | 148 |
| Figure 34 : | Courbe dose-réponse de la cocaïne sous le protocole de FR1..... | 149 |
| Figure 35 : | Auto-administration sous un protocole de PR..... | 150 |
| Figure 36 : | Planning des perfusions intracardiaques à la fin des 7 jours d'auto-administration dans le protocole de FR1..... | 151 |
| Figure 37 : | Niveaux de coupe et zones analysées dans les études immunohistochimiques..... | 152 |

Tableaux

| | | |
|-------------|---|-----|
| Tableau 1 : | Caractéristiques des récepteurs de la dopamine..... | 11 |
| Tableau 2 : | Critères de la dépendance selon le DSM-IV..... | 25 |
| Tableau 3 : | Modifications covalentes des histones et résidus concernés..... | 41 |
| Tableau 4 : | Maladies attribuées à des dysfonctionnements épigénétiques..... | 48 |
| Tableau 5 : | Coordonnées d'implantation des guide-canules et d'injections intracérébrales..... | 142 |
| Tableau 6 : | Liste des anticorps utilisés dans les études immunohistochimiques..... | 153 |

Liste des abréviations

| | | | |
|---------|--|----------|---|
| 5-HT | Sérotonine | DAB | 3,3'-diaminobenzidine |
| 5-HTT | Transporteur de la sérotonine | DARPP-32 | « Dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein with a molecular weight of 32 kDa » |
| AA | Auto-administration | DAT | Transporteur de la dopamine |
| AC | Adénylate cyclase | DMSO | Dimethylsulfoxyde |
| Ach3 | Forme acétylée de l'histone H3 (K9/K13) | DNMT | ADN méthyltransférase |
| Ach4 | Forme acétylée de l'histone H4 (K5/K8/K12/K16) | DSM IV | « Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders – IVth Revision » |
| ADN | Acide désoxyribonucléique | eNOS | NOS endothéliale |
| AMPA | α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionate | FR1 | Protocole de ratio fixe (ratio = 1) |
| ANP | « Atrial natriuretic peptide » | GABA | Acide γ -aminobutyrique |
| ARN | Acide ribonucléique | GC | Guanylate cyclase |
| BLA | Amygdale baso-latérale | GTP | Guanosine triphosphate |
| BNP | « Brain-derived natriuretic peptide » | HAT | Histone acétyltransférase |
| Br-cG | 8-bromo-cGMP | HDAC | Histone désacétylase |
| CaMK | Kinase modulée par le calcium | HMT | Histone méthyltransférase |
| cAMP | Adénosine 3'-5'-monophosphate cyclique | ICF | « Immunodeficiency, centromere instability, facial anomalies » |
| CB1/CB2 | Récepteur des endocannabinoïdes de type 1 / 2 | iNOS | NOS inductible |
| CBP | Protéine de liaison au facteur CREB | InsP3 | Inositol triphosphate |
| cGMP | Guanosine 3'-5'-monophosphate cyclique | i.p. | Intrapéritonéal |
| CNG | « Cyclic nucleotide-gated channel » | i.v. | Intraveineux |
| CNP | Peptide natriurétique de type C | KO | « Knock out » |
| COMT | Catéchol-O-méthyl-transférase | L-DOPA | L-dihydroxyphénylalanine |
| CPF | Cortex préfrontal | LTD | Dépression à long terme |
| CPFm | Cortex préfrontal médian | LTP | Potentialisation à long terme |
| CpG | Dinucléotide cytosine / guanosine | MAO | Monoamine oxydase |
| CPP | Préférence de place conditionnée | MBD | Domaine de liaison à l'ADN méthylé / Protéine à MBD |
| CPu | Noyau caudé / Putamen | MeCP2 | « Methyl-CpG-binding protein 2 » |
| CREB | « cAMP response element binding protein » | mGluR | Récepteur métabotrope du glutamate |
| DA | Dopamine | MSN | Neurones épineux de taille moyenne |

| | | | |
|------|---|----------|---|
| NA | Noradrénaline | PKG | Protéine kinase G (dépendante du cGMP) |
| NAc | Noyau accumbens | PLC | Phospholipase C |
| NAcC | Partie « core » du noyau accumbens | PP/PPase | Sérine/thréonine protéine phosphatase |
| NAcS | Partie « shell » du noyau accumbens | PR | Protocole de ratio progressif |
| NCP | Particule du cœur du nucléosome | sGC | Guanylate cyclase soluble |
| NEP | Endopeptidase neutre | SIRT | Sirtuine |
| NET | Transporteur de la noradrénaline | SEM | Erreur standard de la moyenne |
| NLS | Signal de localisation nucléaire | Ser | Sérine |
| NMDA | N-méthyl-D-aspartate | SNC | Système nerveux central |
| nNOS | NOS neuronale | TH | Tyrosine hydroxylase |
| NO | Monoxyde d'azote | TRD | Domaine de répression de la transcription |
| NOS | NO synthétase | VASP | « Vasodilatator-stimulated phosphoprotein » |
| NP | « Nose Poke » | VMAT | Transporteur vésiculaire des monoamines |
| NPR | Récepteur des peptides natriurétiques | VTA | Aire tegmentale ventrale |
| OA | Orifice actif | | |
| PDE | Phosphodiesterase des nucléotides cycliques | | |
| PKA | Protéine kinase A (dépendante du cAMP) | | |

Du fait de leur usage plus répandu, certaines abréviations anglaises ont été préférées à leurs équivalents français.

Introduction générale

La consommation abusive de drogues constitue un problème majeur de santé publique, mais également une problématique sociale prégnante. Au delà des situations individuelles dramatiques qu'elle engendre, elle est également à la base d'enjeux internationaux de première importance. La cocaïne, en particulier, fait partie des substances illicites les plus consommées à travers le monde, et son pouvoir toxicomanogène est parmi les plus forts.

Malgré des avancées considérables, les mécanismes qui sous-tendent les effets à long terme des drogues restent mal compris ; en particulier, on ignore encore quels sont précisément les phénomènes qui mènent une minorité des consommateurs réguliers à développer une dépendance. Peu d'approches thérapeutiques efficaces existent à l'heure actuelle contre cette pathologie chronique et hautement récidivante, et de nouvelles pistes sont à explorer. D'autre part, l'étude de l'action des drogues constitue potentiellement une approche importante pour la compréhension du fonctionnement cérébral. Les dysfonctionnements comportementaux et psychologiques observés chez les sujets dépendants en sont la première démonstration : la mise en place de la dépendance découle du dérèglement des fonctions cognitives essentielles que sont la motivation, la prise de décision et la planification à long terme. En cela, la puissance de l'effet des substances toxicomanogènes a quelque chose de fascinant ; son étude permet de mieux comprendre les processus qu'impliquent nos comportements quotidiens.

Le travail présenté dans ce mémoire s'intéresse à une voie de signalisation intracellulaire, celle de la guanosine monophosphate 3'-5' cyclique (cGMP). Ce nucléotide cyclique ubiquitaire est impliqué dans de nombreuses fonctions physiologiques, et son action dans le fonctionnement des circuits neuronaux est démontrée. En particulier, il joue un rôle dans les mécanismes cellulaires et synaptiques à la base de neuroadaptations à long terme. Nous avons étudié l'influence de manipulations de cette voie sur l'action de la cocaïne dans un test comportemental complexe, l'auto-administration intraveineuse de drogue.

Ce paradigme, basé sur un protocole de conditionnement opérant, donne à l'animal la possibilité de déclencher lui-même l'administration de la substance ; il se décline en différents protocoles qui permettent de modéliser divers aspects de la consommation de drogue. Très utilisée pour la cocaïne, l'auto-administration intraveineuse représente le dispositif comportemental permettant au mieux d'évaluer l'effet renforçant d'une substance, mais également les processus internes à l'animal confronté à une substance toxicomanogène : motivation, discrimination entre renforçateurs, susceptibilité individuelle et influence des conditions de vie. Il s'agit donc d'un outil puissant pour étudier les effets à court, moyen et long terme des drogues. Il est particulièrement

adapté à l'étude de l'influence comportementale de modulations de voies de signalisation intracellulaires.

Notre équipe a démontré que des protéines impliquées dans des régulations d'ordre épigénétique sont mises en jeu dans l'action de la cocaïne, notamment dans le comportement d'auto-administration. Les mécanismes épigénétiques régulent la transcription des gènes par remodelage de la chromatine. Ils représentent le lien entre des stimuli environnementaux et leurs effets durables sur la transcription. Ils sont de plus en plus étudiés en rapport avec l'action des drogues, car ils constituent une piste très intéressante pour comprendre les effets à long terme de ces substances. Le risque de rechute, c'est-à-dire la reprise de la consommation d'une drogue après son arrêt, est en effet toujours latent chez un sujet dépendant, même après une longue période d'abstinence. A l'heure actuelle, les mécanismes épigénétiques constituent les seuls processus connus qui présentent une cinétique permettant l'explication d'un tel phénomène.

Ainsi, le deuxième objectif du travail présenté ici était de rechercher l'implication de mécanismes épigénétiques en lien avec les effets de la voie du cGMP. Nous nous sommes en particulier focalisés sur les deux processus complémentaires que sont la méthylation de l'ADN et l'acétylation des histones, processus déjà mis en cause, y compris par des études de notre laboratoire, dans les effets comportementaux de la cocaïne.

Le présent mémoire est divisé en trois parties. Dans une première partie, nous passons en revue les données issues de la littérature qui permettent de cerner le contexte scientifique du travail. Seront ainsi présentées la cocaïne, son action sur le cerveau et la pathologie qu'est la dépendance, puis la voie de signalisation du cGMP et, enfin, les régulations de type épigénétique. Dans une deuxième partie, nous présentons les données expérimentales obtenues au cours de ce travail de thèse, sous la forme de deux articles soumis pour publication et de résultats complémentaires. Enfin, une discussion générale fait le bilan de ces données et les met en perspective afin de proposer des conclusions quant à la pertinence de la voie du cGMP pour l'étude de l'action de la cocaïne. À la fin du mémoire, des précisions méthodologiques permettent de mieux appréhender les expérimentations menées dans ce travail.

Contexte scientifique

Partie I : Cocaïne et cerveau

Partie II : Régulations épigénétiques

Partie III : La voie du GMP cyclique

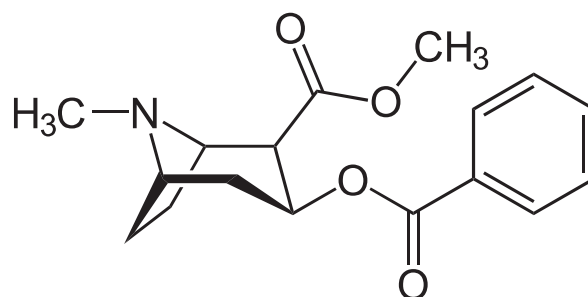
Partie I : Cocaïne et cerveau

A - La cocaïne

A-1 Caractéristiques et usages

La cocaïne est un alcaloïde végétal issu de la feuille du cocaïer *Erythroxylon coca* (Figure 1). Psychotrope appartenant à la famille des psychostimulants, comme la caféine ou les amphétamines, elle fait partie des substances dont le commerce et la consommation sont prohibés dans la plupart des pays, et ce depuis le milieu du vingtième siècle (entériné par la convention unique sur les stupéfiants, ONU, 1961).

Figure 1 :
Structure de la cocaïne



La cocaïne peut être consommée de différentes manières, dont dépendent l'amplitude et la rapidité de ses effets. La pâte de coca, issue de la feuille, est consommée mâchée depuis des millénaires pour sa capacité à réduire les sensations de fatigue et de faim. Aujourd'hui, la cocaïne est plus communément consommée par voie intranasale sous forme de poudre de chlorhydrate de cocaïne, ou fumée sous sa forme basique, le « crack », pour des effets beaucoup plus intenses et rapides, mais aussi plus délétères. Elle peut également être injectée par voie intraveineuse.

On estime qu'environ 0,3 % de la population mondiale a consommé de la cocaïne au cours de l'année écoulée, ce qui la place au troisième rang des substances illicites. Toutefois, son usage est considéré comme l'un des plus problématiques, avec celui des opiacés, du fait des complications médicales liées à une consommation régulière, du fait de ses fortes propriétés toxicomanogènes, mais également du fait des conséquences géopolitiques importantes de sa production et de son commerce. La consommation de cocaïne dans un pays est corrélée au taux de crimes violents, et le trafic de cocaïne constitue le moyen de financement de divers groupes armés et organisations

criminelles internationales. (World Drug Report, 2010 et 2012, UNODC, United Nations Office on Drugs and Crimes).

A-2 Effets de la prise aiguë de cocaïne

La prise de psychostimulants induit une augmentation de la vigilance ainsi qu'une amélioration des capacités physiques et des facultés intellectuelles, en partie subjective. La cocaïne réduit la sensation de fatigue et provoque une forte euphorie ; elle est également anorexigène (Johanson & Fischman, 1989). Une prise unique peut déclencher des céphalées, une hyperthermie, voire des convulsions du fait de l'abaissement du seuil épiléptogène. Chez le rongeur, une injection aiguë de cocaïne déclenche une augmentation rapide et transitoire de l'activité locomotrice et une diminution de l'anxiété, mais aussi l'apparition de mouvements répétés et de convulsions .

L'effet euphorisant de la prise de cocaïne est suivi par un phénomène de « crash », pendant lequel l'individu ressent un mal-être généralisé dû à des phénomènes homéostatiques. Cette période est caractérisée par une anxiété accrue, une très forte fatigue, avec un tableau dépressif. La sensation de « crash » s'accroît après chaque prise de cocaïne, participant à la mise en place de la dépendance.

A-3 Effets d'un usage chronique de cocaïne

L'usage régulier de cocaïne peut induire un large panel de complications médicales, qu'elles soient neurologiques ou somatiques. Une grande partie de ces complications découle de son action sur le système cardiovasculaire. En effet, la cocaïne est un sympathomimétique indirect ; elle induit une augmentation du rythme cardiaque et une très forte vasoconstriction des vaisseaux, ce qui peut induire la nécrose de certains tissus à plus ou moins long terme. Un usage chronique peut également conduire à l'apparition d'arythmies cardiaques, voire d'infarctus du myocarde, du fait de la réduction de la contractilité du muscle cardiaque. Les ischémies cérébrales et les hémorragies cérébro-méningées peuvent induire une atrophie cérébrale diffuse (Pascual-Leone *et al.*, 1991) et les perturbations observées de la circulation sanguine cérébrale se maintiennent, même après l'arrêt de la consommation, pendant plusieurs années. (Volkow *et al.*, 1992)

Des complications pulmonaires se développent également suite à l'abus de cocaïne, principalement chez les usagers de crack. L'intoxication aiguë même peut dans certains cas mener au décès par oedème pulmonaire (Perper & Van Thiel, 1992). D'un point de vue psychologique, la

consommation chronique de cocaïne peut aboutir au développement de psychoses de type paranoïde, avec hallucinations et délires (Post, 1975 ; Vorspan *et al.*, 2012). Apparaissent aussi chez certains consommateurs réguliers des troubles de l'expression verbale et de la mémoire (Ardila *et al.*, 1991). Enfin, on observe parfois l'apparition de dysfonctionnements sexuels de type anorgasmique (Cocores *et al.*, 1988).

La consommation régulière de la cocaïne peut aboutir à l'installation d'un état de dépendance, pathologie qui sera abordée en D. L'arrêt de la consommation laisse place à l'apparition d'un syndrome de sevrage, que l'on a longtemps cru inexistant pour la cocaïne. En effet, il ne comprend pas les manifestations physiques extrêmes des sevrages à l'héroïne ou à l'alcool, mais s'exprime par une anxiété très importante, une dysphorie, une fatigue intense et de l'irritabilité (DSM IV, Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders – IVth Revision, American Psychiatric Association, 1994).

Chez le rongeur, un traitement chronique par la cocaïne provoque l'apparition d'un phénomène de sensibilisation locomotrice : l'hyperlocomotion induite par la drogue augmente à chaque injection. Ce phénomène, que l'on observe surtout avec les psychostimulants, est à la base de modèles d'étude des drogues (voir E-1), et de théories de la dépendance (voir D-2).

A-4 Pharmacocinétique et catabolisme de la cocaïne

Les effets d'une prise de cocaïne dépendent du mode d'administration. Ceci découle notamment du temps nécessaire à l'arrivée de la cocaïne au niveau sanguin et de sa dilution dans la circulation générale (Haddah & Winchester, 1990). Ainsi, consommée par voie orale, la cocaïne apparaît dans la circulation sanguine environ 30 minutes après ingestion, pour un pic plasmatique obtenu en 50 à 90 minutes. Par voie nasale, les effets commencent 3 minutes après la prise, le pic étant mesuré après 15 minutes. Les deux modes d'administration induisant les effets les plus rapides sont l'injection intraveineuse, avec un pic en quelques dizaines de secondes, et l'inhalation de la fumée du crack, avec un pic mesuré autour de 10 secondes. Dans ces deux cas, les effets sont très violents et de courte durée (10 à 20 minutes) (Clarke, 1986).

La demi-vie de la cocaïne chez l'homme dépend du mode de prise, de la quantité administrée et de paramètres liés au sujet, et elle se situe entre 40 et 90 minutes. La cocaïne peut être transformée dans l'organisme selon trois réactions (Fleming *et al.*, 1990 ; Figure 2). D'une part, elle peut être hydrolysée par des estérases hépatiques et plasmatiques pour former l'ester de

méthylecgonine ; cette réaction est la voie principale du catabolisme de la cocaïne, et représente une piste de traitement pharmacologique contre la dépendance à cette drogue (voir D-3). D'autre part, la cocaïne peut être déméthylée en benzoylecgonine ; enfin, elle peut subir une N-déméthylation. Dans ce cas, le métabolite obtenu, la norcocaïne, possède aussi des propriétés renforçantes : des études indiquent qu'il participerait aux effets d'une prise de drogue (Wang *et al.*, 2001).

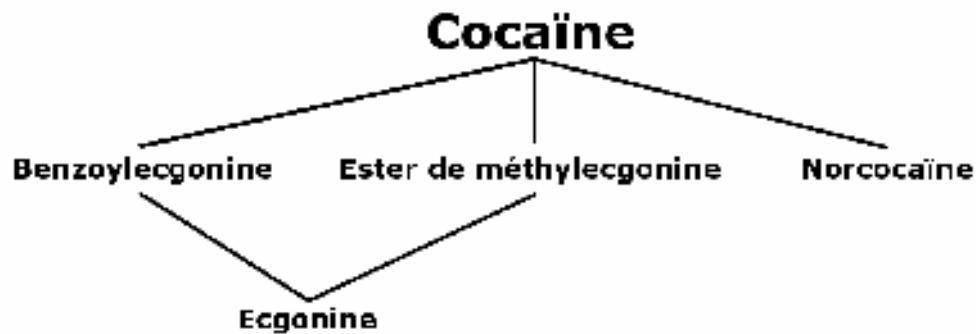


Figure 2 : Voies de dégradation de la cocaïne

La cocaïne est hydrolysée en ester de méthylecgonine, en benzoylecgonine ou en norcocaïne. Ester de méthylecgonine et benzoylecgonine se combinent pour former l'ecgonine.

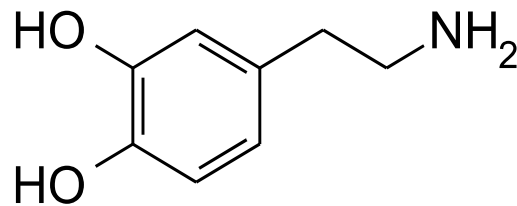
L'usage combiné d'alcool et de cocaïne, très fréquent (Wiseman & McMillan, 1996), mène à la formation de cocaéthylène, éthylester de la benzoylecgonine. Ce métabolite augmente la concentration plasmatique de cocaïne et amplifie à la fois l'euphorie induite par la drogue et sa toxicité (McCance *et al.*, 1995).

B - Neurotransmissions modulées par la cocaïne

Dans le système nerveux central (SNC), la cocaïne agit par l'inhibition des transporteurs des monoamines. Il s'agit donc d'un modulateur direct des neurotransmissions. Pour comprendre les mécanismes qui sous-tendent les conséquences comportementales de sa consommation, et mieux appréhender comment des agents pharmacologiques peuvent contrer ses effets, il est donc utile de passer en revue les principaux systèmes de neurotransmission et leur implication dans les mécanismes d'action de la drogue.

B-1 La dopamine

Figure 3 :
Structure de la dopamine



B-1-1 Les voies dopaminergiques

Au sein du SNC, on distingue neuf noyaux dopaminergiques, nommés A8 à A16, dont sont issues des projections pouvant être réparties en 3 catégories. Les systèmes à fibres très courtes comprennent les neurones dopaminergiques de la rétine et les cellules périglomérulaires du bulbe olfactif. Les systèmes à fibres courtes ou intermédiaires comprennent, d'une part, les neurones dopaminergiques issus des noyaux arqué et périventriculaire de l'hypothalamus qui projettent sur l'hypophyse et, d'autre part, les neurones de la voie périventriculaire, issus du pont, du mésencéphale et du diencéphale et qui projettent vers l'hypothalamus, les noyaux du raphé ou encore l'habénula. Enfin, les systèmes à fibres longues sont constitués des voies nigrostriée et mésocorticolimbique (Figure 4).

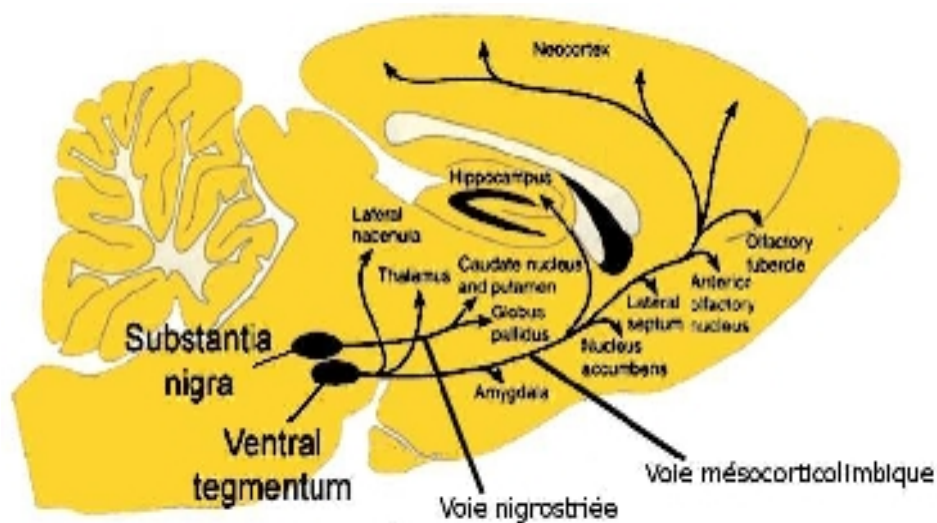


Figure 4 : Anatomie des voies dopaminergiques à fibres longues

On distingue la voie nigrostriée, issue de la substance noire (« Substantia nigra »), et la voie mésocorticolimbique, issue de l'aire tegmentale ventrale (« Ventral tegmentum »).

a) La voie nigrostriée

Les corps cellulaires des neurones de la voie nigrostriée sont situés dans la substance noire pars compacta (aire A9). Ils projettent vers le striatum, plus particulièrement vers les noyaux caudé et putamen (fusionnés chez le rat, CPU) et la partie « core » du noyau accumbens (NAcC). Cette voie a un rôle prépondérant dans l'initiation et le contrôle des mouvements extrapyramidaux, comme le démontre le tableau clinique de la maladie de Parkinson, qui découle de la dégénérescence des neurones de ce système (Barbeau, 1970).

b) La voie mésocorticolimbique

La voie mésocorticolimbique prend également naissance dans le mésencéphale, au sein de l'aire tegmentale ventrale (VTA, aire A10). Ces neurones projettent sur différentes structures limbiques et corticales. On peut séparer la voie mésolimbique, qui projette vers l'amygdale, le septum et la partie « shell » du NAc (NAcS), de la voie mésocorticale, qui rejoint les cortex préfrontal (CPF), cingulaire antérieur, piriforme et entorhinal. La voie mésocorticolimbique est impliquée dans des processus affectifs, cognitifs et attentionnels, et notamment dans les mécanismes motivationnels. Elle représente en effet le cœur du groupe de structures connu sous le nom de « système de récompense » (voir C).

B-1-2 La synapse dopaminergique

a) Cycle synaptique de la dopamine

La dopamine (DA, figure 3) est synthétisée au niveau des terminaisons synaptiques à partir de la tyrosine selon une réaction en deux étapes (Figure 5) : la L-tyrosine est d'abord convertie en L-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA) sous l'action de la tyrosine hydroxylase (TH), puis la L-DOPA est convertie en DA par la L-DOPA décarboxylase. La première étape est l'étape limitante, et la TH est régulée par de multiples facteurs. En effet, cette enzyme est un homotétramère dont chaque sous-unité possède, en plus du domaine catalytique, un domaine régulateur dans la région N-terminale ; ce domaine est la cible de différentes protéine kinases, et la phosphorylation de ses résidus sérine (en position 19, 31, 40 ou 153) augmente l'activité catalytique (Joh *et al.*, 1978, voir d).

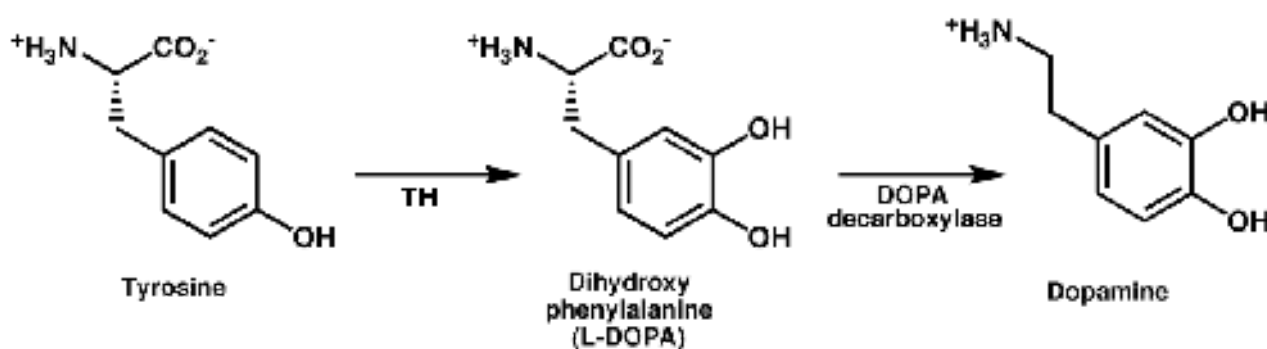


Figure 5 : Métabolisme de la dopamine
TH : Tyrosine Hydroxylase

La DA est stockée dans des vésicules synaptiques au niveau des terminaisons axonales et libérée par exocytose selon un processus dépendant du calcium et déclenché par l'arrivée d'un potentiel d'action. Dans la fente synaptique, la DA stimule des récepteurs pré- et post-synaptiques. Le transporteur DAT recapture la DA dans l'élément présynaptique où elle est soit dégradée, soit à nouveau stockée dans les vésicules. La dégradation de la DA se fait par l'action successive de deux enzymes, la catéchol-O-méthyl-transférase (COMT) et la monoamine oxydase (MAO), aboutissant à la formation d'acide homovanillique.

b) Les récepteurs de la dopamine

Les récepteurs de la DA appartiennent à la superfamille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Cinq sous-types, codés par des gènes distincts, ont été

identifiés (Bunzow *et al.*, 1988 ; Dearry *et al.*, 1990 ; Sokoloff *et al.*, 1990 ; Sunahara *et al.*, 1991 ; Van Tol *et al.*, 1991) ; ils sont regroupés en deux familles, la famille D1 et la famille D2 (Tableau 1).

Les gènes des récepteurs de la famille D₁ (D₁ et D₅) ne possèdent pas d'introns susceptibles de produire des variants par épissage alternatif. Ces récepteurs sont couplés à une protéine G_s qui active une adénylate cyclase (AC) (Kebabian *et al.*, 1984), ou parfois à une G_q qui induit la production d'inositol-triphosphate (InsP₃) par l'intermédiaire de la phospholipase C (PLC) (Undie & Friedman, 1990). Le récepteur D₁ est le sous-type le plus exprimé dans les structures cérébrales (Weiner *et al.*, 1991 ; Fremeau *et al.*, 1991) ; on le détecte notamment dans les aires de projection des neurones dopaminergiques que sont le bulbe olfactif, le CPu, le NAc, mais aussi l'hypothalamus et le thalamus. Le récepteur D₅, peu exprimé dans le SNC, se trouve dans l'hippocampe et les noyaux thalamiques.

Les gènes des récepteurs de la famille D₂ (D₂ à D₄) possèdent des introns susceptibles de produire des variants par épissage alternatif. Ces récepteurs sont couplés à une protéine G_{i/o} qui inhibe une AC (Cooper *et al.*, 1986). La présence du récepteur D₂ est détectée dans le striatum, le CPF, l'hypothalamus, la substance noire et la VTA (Bouthenet *et al.*, 1991). Le récepteur D₃ est exprimé dans le NAc, la substance noire, la VTA, les tubercules olfactifs, l'hippocampe et le cervelet, et faiblement au niveau du CPu (Sokoloff *et al.*, 1990 ; Bouthenet *et al.*, 1991). Le récepteur D₄ se trouve dans le CPF, le CPu, l'amygdale, le cervelet et l'hippocampe (Van Tol *et al.*, 1991).

Les récepteurs de la famille D₁ sont localisés sur les neurones postsynaptiques, alors que les récepteurs D₂ ont une localisation à la fois pré- et postynaptique (Sokoloff *et al.*, 2006 ; Rondou *et al.*, 2010). La liaison de la DA sur ces récepteurs a des effets différents. L'activation de la famille D₁ provoque l'entrée du calcium dans le neurone et inhibe l'activité de la Na⁺/K⁺ ATPase (Lin *et al.*, 1995 ; Horiuchi *et al.*, 1993) alors que l'activation de la famille D₂ inhibe l'entrée du calcium, augmente son stockage dans le réticulum endoplasmique, et active la pompe (Malgaroli *et al.*, 1987). Les récepteurs de la famille D₁ sont donc associés à une augmentation de l'activité du neurone, tandis que ceux de la famille D₂ réduisent son excitabilité (Seamans *et al.*, 2004).

Les récepteurs de la DA présentent des similitudes structurales, mais aussi de grandes différences. Leur région C-terminale est riche en résidus sérine et thréonine, qui constituent des sites potentiels de régulation par phosphorylation (Jaber *et al.*, 1996).

| Famille | Famille D ₁ | | Famille D ₂ | | |
|----------------------------------|--|------------------------------------|---|--|---|
| Récepteur | D ₁ | D ₅ | D ₂ | D ₃ | D ₄ |
| Protéine de couplage | Gs | Gs, Gq | Gi/o | Gi/o | Gi/o |
| Effet de la liaison de la DA | Activation AC | Activation AC, Activation PLC | Inhibition AC | Inhibition AC | Inhibition AC |
| Localisation synaptique | Présynaptique | Présynaptique | Pré- et postsynaptique | Pré- et postsynaptique | Présynaptique |
| Localisation centrale principale | Striatum, tubercules olfactifs, cortex, thalamus, hypothalamus | Hippocampe, thalamus, hypothalamus | Striatum, SN, VTA, tubercules olfactifs, cortex, hypothalamus | Tubercules olfactifs, NAc, SN, VTA, hippocampe, cervelet | Amygdale, cortex, hippocampe, cervelet, CPU |
| Localisation périphérique | Artères, rein, tractus digestif | Artères, rein, tractus digestif | Terminaisons synaptiques, système nerveux entérique, area postrema, hypophyse | Rein, area postrema | Rein, coeur |

AC : Adénylate cyclase ; CPU : Noyau caudé/putamen ; NAc : Noyau accumbens ; PLC : Phospholipase C ; SN : Substance noire ; VTA : Aire tegmentale ventrale

c) Les transporteurs de la dopamine

On trouve deux types de transporteurs de la DA : les transporteurs vésiculaires VMAT (vesicular monoamine transporters) et le transporteur DAT (dopamine transporter) situé sur la membrane plasmique.

Comme leur nom l'indique, les VMAT ont en charge la capture des monoamines du cytosol vers les vésicules synaptiques, couplée à la sortie de protons (Liu & Edwards, 1997). Ils comprennent douze segments transmembranaires et une longue boucle intravésiculaire entre le premier et le deuxième segment. Ils ne sont pas spécifiques de la DA et interviennent également dans le stockage de la sérotonine (5-HT), de la noradrénaline (NA) et de l'histamine. Parmi les deux types de VMAT identifiés, VMAT₁ et VMAT₂, seul le dernier, neuronal, possède une forte affinité pour la DA.

Le DAT est également une protéine à douze segments transmembranaires, avec une longue boucle extracellulaire située entre le troisième et le quatrième segment. Sa sélectivité pour la DA est très forte (Kitayama *et al.*, 1992). Les cinq premiers segments transmembranaires dans la partie N-

terminale constituent le site du transport des molécules : l'entrée du substrat dans la cellule est couplée au cotransport de deux ions sodium et d'un ion chlorure (Sonders *et al.*, 1997). La partie centrale du DAT est le site de fixation des antidépresseurs tricycliques et de la cocaïne (Buck & Amara, 1994). Le DAT possède en outre des sites de glycosylation et de phosphorylation : les protéine kinases A, C ou la Ca²⁺/calmoduline kinase modulent son activité (Foster *et al.*, 2006).

d) Voies de régulation de la neurotransmission dopaminergique

La neurotransmission dopaminergique possède de nombreuses voies d'auto-régulation. Son blocage par des antagonistes des récepteurs ou par des lésions induit par exemple une augmentation de l'expression des gènes codant les récepteurs D₂, mais pas D₁ (Jaber *et al.*, 1996). La TH peut être modulée par phosphorylation, notamment par les kinases dépendantes du cAMP ou du cGMP (PKA/PKG), ou par la Ca²⁺/calmoduline kinase (CaM kinase) (Roskoski *et al.*, 1987 ; Zigmond *et al.*, 1989). La DA réduit ainsi sa propre synthèse en se fixant sur les récepteurs D₂ et D₃ (Kreiss *et al.*, 1995 ; Gobert *et al.*, 1996) : l'inhibition d'une AC dans le neurone présynaptique diminue l'activité de la PKA (Onali & Olanas, 1989). L'inhibition de la PKA augmente aussi l'activité du DAT, ce qui réduit encore la concentration de DA dans la fente synaptique (Batchelor & Schenk, 1998). À l'inverse, une activation prolongée des neurones dopaminergiques provoque l'augmentation de la transcription du gène de la TH (Best *et al.*, 1995).

e) Effet de la cocaïne sur la neurotransmission dopaminergique

La cocaïne agit en se fixant sur le DAT et en bloquant son activité. Des études d'imagerie montrent ainsi une corrélation très importante entre l'occupation du récepteur par la cocaïne et l'effet ressenti par le sujet consommant la drogue (Volkow *et al.*, 1997). En présence de cocaïne, la DA s'accumule rapidement dans la fente synaptique ; il s'agit donc d'un agoniste dopaminergique indirect. Cette augmentation de la DA synaptique peut être mesurée par microdialyse dans le CPF, le CPu et le NAc, mais également dans les aires d'origine des projections, VTA et substance noire (Di Chiara & Imperato, 1988 ; Maisonneuve *et al.*, 1990).

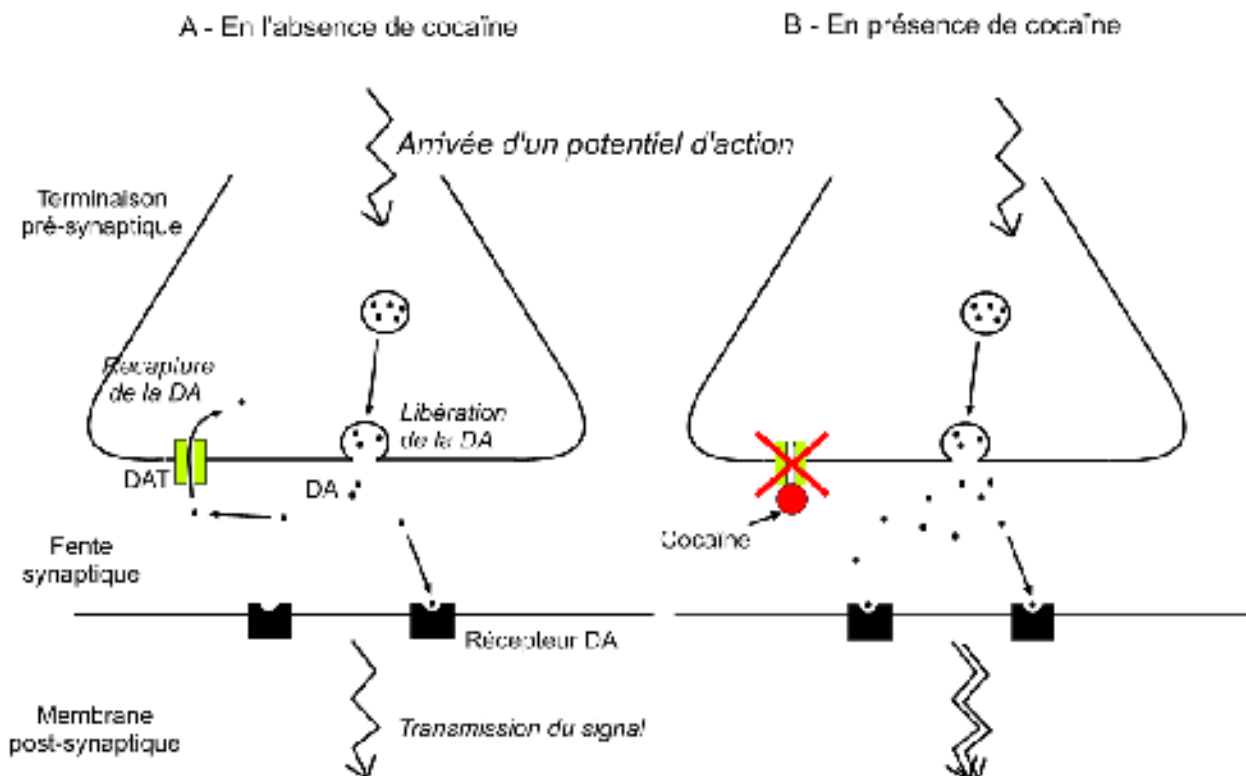


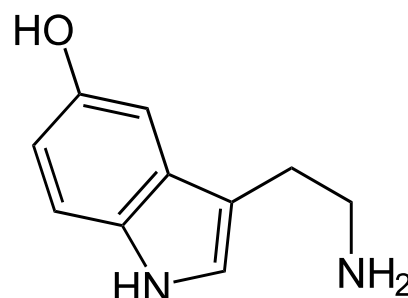
Figure 6 : Action de la cocaïne sur la synapse dopaminergique

La cocaïne bloque l'activité du transporteur de la dopamine (DAT) et augmente ainsi la concentration de dopamine dans la fente synaptique. Le signal est donc amplifié dans le neurone postsynaptique.

L'administration répétée de cocaïne n'est pas liée à un phénomène de tolérance. Au fil du temps, la libération de DA dans le NAc et le CPU augmente ; il s'agit d'une sensibilisation neurochimique, qui est considérée comme étant à la base de la sensibilisation comportementale (Parsons *et al.*, 1991).

B-2 La sérotonine

Figure 7 : Structure de la sérotonine



B-2-1 Les voies sérotoninergiques

Les neurones synthétisant la 5-HT sont peu nombreux dans le SNC et se concentrent au sein des noyaux du raphé (B1 à B9) (Anden *et al.*, 1965). Ils sont à la base de nombreuses projections diffuses ascendantes et descendantes (Figure 8 ; Jacobs & Azmitia, 1992). Ainsi, des projections se dirigeant vers le tronc cérébral et la moelle sont issues des noyaux les plus postérieurs (B1 à B4). À l'opposé, les noyaux antérieurs innervent l'ensemble du cerveau selon deux faisceaux : le faisceau dorsal, issu du noyau dorsal du raphé et qui innerve le cervelet, l'amygdale, l'hippocampe ventral et les cortex frontal, pariétal et occipital, et le faisceau ventral, issu du noyau médium du raphé, qui innerve le septum, l'amygdale, l'hippocampe dorsal, le thalamus et le NAc. L'innervation sérotoninergique est importante au niveau des structures limbiques, ce qui implique ce système dans la régulation de l'humeur et des émotions.

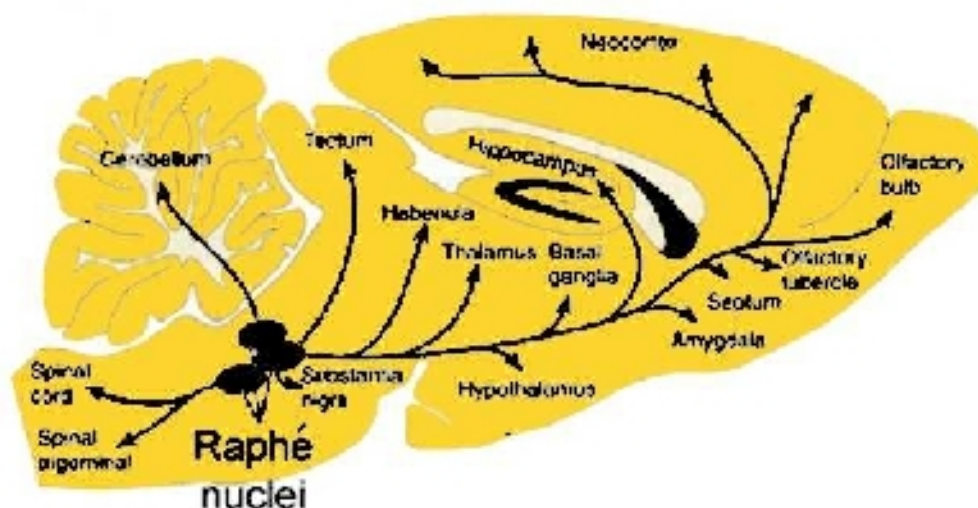


Figure 8 : Anatomie des voies sérotoninergiques

Originaires des noyaux du raphé, les neurones sérotoninergiques projettent vers de nombreuses structures cérébrales.

B-2-2 La synapse sérotoninergique

La 5-HT est synthétisée en deux étapes (Figure 9). D'une part, le L-tryptophane est converti en 5-hydroxytryptophane sous l'action de la tryptophane hydroxylase ; comme pour la DA, cette première étape est l'étape limitante. La décarboxylase des acides aminés convertit ensuite le 5-hydroxytryptophane en 5-HT (Walther *et al.*, 2003). Une fois synthétisée, la 5-HT est stockée dans les vésicules synaptiques par les VMAT (Weihe *et al.*, 1994) pour être libérée par exocytose.

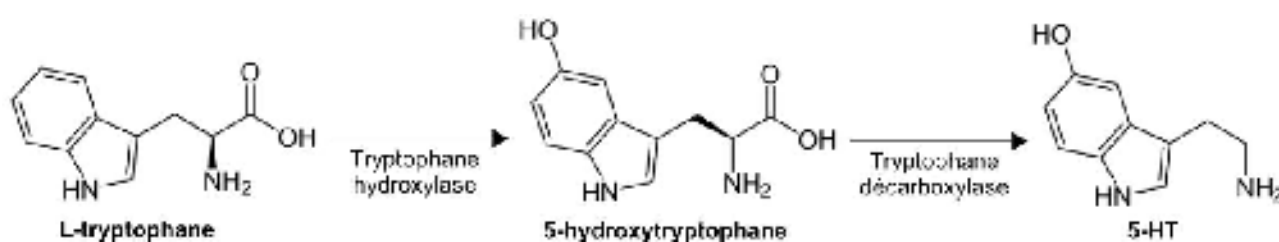


Figure 9 : Métabolisme de la sérotonine

5-HT : sérotonine

Le transporteur de la sérotonine (5-HTT) assure la recapture de la sérotonine libérée par un symport des ions sodium et chlorure, comme le DAT (Torres & Amara, 2007). Le 5-HTT est au coeur de nombreuses approches thérapeutiques, en particulier dans le cadre du traitement des troubles de l'humeur et de la personnalité, avec l'utilisation des inhibiteurs de la recapture de la 5-HT (Jones & Blackburn, 2002). La dégradation de la 5-HT est catalysée par la MAO.

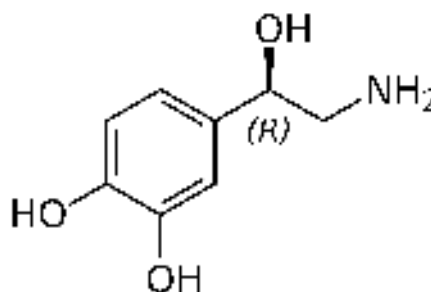
Au moins quatorze sous-types de récepteurs de la 5-HT ont été identifiés et répartis en 7 familles, de 5-HT₁ à 5-HT₇ (Filip & Bader, 2009). Ils appartiennent à la superfamille des récepteurs à sept segments transmembranaires couplés aux protéines G, à l'exception des récepteurs 5-HT₃ qui sont couplés à un canal cationique (Derkach *et al.*, 1989) et dont l'activation présynaptique dépolarise la membrane, stimulant la libération de neurotransmetteurs (Blandina *et al.*, 1988, Alhaider *et al.*, 1991, Martin *et al.*, 1992). Les récepteurs 5-HT₁ (de 1A à 1F) et 5-HT₅ (5A et 5B) sont couplés à des protéines Gi/o qui inhibent une AC ; ils sont hyperpolarisants par ouverture d'un canal potassique et fermeture d'un canal calcique (Nelson, 2004). Les récepteurs 5-HT₂ (2A à 2C) sont couplés à des protéines Gq dont l'activation stimule la formation d'InsP₃ par activation de la PLC et augmente ainsi la concentration calcique intracellulaire (Baxter *et al.*, 1995). Les récepteurs 5-HT₄, 5-HT₆ et 5-HT₇ sont couplés à des protéines Gs qui activent une AC (Costall & Naylor, 1993).

B-2-3 Implication dans l'action de la cocaïne

Bien que la dopamine soit la neurotransmission essentielle dans l'effet récompensant de la cocaïne, l'action de la drogue sur le système sérotoninergique a été démontrée par de nombreuses études. En effet, la cocaïne agit sur le transporteur de la 5-HT, avec une affinité plus grande que dans le cas du DAT (Ritz *et al.*, 1990). Des travaux indiquent par exemple que l'inactivation du gène codant pour ce transporteur supprime l'auto-administration de cocaïne chez la souris (Thomsen *et al.*, 2009). L'activation du système sérotoninergique amplifierait les effets euphorisants de la cocaïne, et sa dérégulation suite à l'abus de la drogue participerait au sevrage et à la mise en place de la dépendance (Parsons *et al.*, 1996). De même, des études de notre laboratoire montrent que l'inactivation de la neurotransmission sérotoninergique par des lésions ou des antagonistes des récepteurs 5-HT₃ diminue l'expression de gènes précoces induite par la cocaïne (Humblot *et al.*, 1998). La fluoxétine, un inhibiteur de la recapture de la 5-HT, mime des effets de la cocaïne sur la transcription (Thiriet *et al.*, 1998).

B-3 La noradrénaline

Figure 10 :
Structure de la noradrénaline



B-3-2 Les voies noradrénergiques

Le locus coeruleus, situé dans le pont sous le plancher du quatrième ventricule, est le noyau noradrénergique principal (noyau A6), contenant la moitié du nombre total de neurones synthétisant la NA dans le cerveau. La voie de projection ascendante qui en est issue, ou voie dorsale, innerve le cortex, l'hippocampe et le cervelet. D'autres projections ascendantes noradrénergiques proviennent des groupes A2, A5 et A7 et ciblent le thalamus, l'hypothalamus et l'amygdale, tandis que des neurones noradrénergiques du pont et de la médulla innervent le bulbe rachidien et la moelle épinière (Foote *et al.*, 1983).

La NA intervient dans les phénomènes d'attention et d'éveil (Berridge & Waterhouse, 2003), dans l'apprentissage et la mémoire (Gibbs & Summer, 2002), mais également dans les réactions au stress, la douleur et les émotions (Weinshenker & Schroeder, 2007).

B-3-2 La synapse noradrénergique

La NA (Figure 10) est une catécholamine synthétisée à partir de la DA au sein des vésicules synaptiques des terminaisons noradrénergiques sous l'action de la DA- β -hydroxylase. Une fois libérée par exocytose, elle peut être recapturée par son transporteur sélectif, le NET (« norepinephrin transporter »), et dégradée par la MAO ou recyclée dans les vésicules synaptiques par les VMAT. Au sein de la fente synaptique, elle peut également être dégradée par la COMT.

Les récepteurs de la NA sont des récepteurs métabotropiques à sept segments transmembranaires couplés à des protéines G. Ils se répartissent en trois familles, α_1 , α_2 et β , qui contiennent chacune trois sous-types de récepteurs identifiés. Les récepteurs α_{1A} , α_{1B} et α_{1C} sont couplés à une protéine Gq qui stimule la production d'InsP3 par activation de la PLC ; les récepteurs α_{2A} , α_{2B} et α_{2C} sont couplés à une protéine Gi qui inhibe une AC ; enfin, les récepteurs β_1 , β_2 et β_3 sont couplés à une protéine Gs qui active une AC (Ruffolo & Hieble, 1994 ; Summers & McMartin, 1993).

B-3-3 Implication dans l'action de la cocaïne

La cocaïne inhibe également le NET, induisant une augmentation de la NA extracellulaire (Florin *et al.*, 1994). La neurotransmission noradrénergique est impliquée dans l'anxiété liée au sevrage à la cocaïne (McDougle *et al.*, 1994 ; Kampman *et al.*, 2001). Un traitement chronique à la cocaïne induit des dysfonctionnements noradrénergiques dans les régions associées au stress et à l'anxiété comme le noyau du lit de la strie terminale (BNST), le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus et l'amygdale (Beveridge *et al.*, 2005). Des traitements visant cette neurotransmission montrent leur efficacité potentielle contre la dépendance dans des études précliniques (Buffalari *et al.*, 2012).

B-4 Autres neurotransmissions

B-4-1 Le GABA

a) Le système GABAergique

L'acide γ -aminobutyrique (GABA) est le principal neurotransmetteur inhibiteur du SNC (Olsen, 2002) ; il est notamment le messenger des interneurons au sein d'un grand nombre de structures cérébrales. Les neurones de projection du striatum sont également GABAergiques.

Le GABA est formé à partir du glutamate sous l'action de la décarboxylase de l'acide glutamique, au niveau des mitochondries. Il agit sur trois types de récepteurs : GABA_A, GABA_B et GABA_C (Barnard *et al.*, 1998). Les récepteurs GABA_A et GABA_C sont ionotropiques et la fixation du GABA sur ces protéines ouvre un canal qui permet un flux entrant d'ions chlorure, ce qui hyperpolarise le neurone. Le récepteur GABA_B est couplé à une protéine Gi/o ; son activation est liée à différentes voies intracellulaires qui contribuent à l'inhibition de l'activité neuronale (Misgeld *et al.*, 1995).

b) Implication dans l'action de la cocaïne

Des interneurons GABAergiques modulent l'activité des noyaux dopaminergiques et des neurones de leurs structures cibles (Wirtshafter & Sheppard, 2001 ; Wilson, 2007) ; le GABA est donc hautement susceptible de réguler l'activité du système mésocorticolimbique. Différentes drogues exercent leur action via la modulation de la neurotransmission GABAergique : l'éthanol, par exemple, est un co-agoniste des récepteurs GABA_A (Ticku *et al.*, 1986). D'autre part, un traitement répété par la cocaïne diminue les taux de GABA dans le striatum et module l'expression des différents sous-types de récepteurs GABA (Jung *et al.*, 1999 ; Yamaguchi *et al.*, 2000 ; Li *et al.*, 2003). L'activation de ce système inhibe l'augmentation de dopamine induite par la cocaïne (Gruen *et al.*, 1992), et des modulateurs de cette neurotransmission ont des effets sur l'auto-administration de cocaïne chez le rat (Goeders *et al.*, 1989 ; Roberts & Andrews, 1997).

B-4-2 Le glutamate

a) Le système glutamatergique

Le glutamate est un neurotransmetteur excitateur utilisé par environ la moitié des synapses du SNC. Il est donc essentiel à un grand nombre de fonctions cognitives ; toutefois, il n'a été reconnu comme neurotransmetteur que tardivement (Takeuchi, 1987 ; Orrego & Villanueva, 1993). Il se fixe à différents types de récepteurs métabotropiques et ionotropiques (Traynelis *et al.*, 2010).

Les récepteurs métabotropiques, mGluR₁ à mGluR₈, se répartissent en trois groupes selon leur séquence et la voie de signalisation qu'ils activent. Les récepteurs du groupe I (mGluR₁ et mGluR₅) sont couplés à l'activation de la PLC et d'une AC, tandis que les récepteurs des groupes II (mGluR₂ et mGluR₃) et III (mGluR₄, mGluR₆, mGluR₇ et mGluR₈) sont couplés à une protéine Gi qui inhibe une AC. Les récepteurs métabotropiques ont essentiellement une action régulatrice : sur le neurone

présynaptique, ils limitent la transmission glutamatergique, et, sur le neurone post-synaptique, ils régulent l'excitabilité neuronale et l'activité des récepteurs ionotropiques.

On distingue trois types de récepteurs ionotropiques du glutamate : les récepteurs α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionate (AMPA), les récepteurs kaïnate et les récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA) (Nakanishi *et al.*, 1998). Ces récepteurs se trouvent sous différentes isoformes et sont la cible de nombreuses régulations. Les récepteurs NMDA et AMPA sont impliqués notamment dans les phénomènes de potentialisation à long terme (Bliss & Collingridge, 1993).

b) Implication dans l'action de la cocaïne

Un traitement répété par la cocaïne mène à l'augmentation des concentrations extracellulaires de glutamate dans l'hippocampe, le NAc, la substance noire et la VTA (Kalivas & Duffy, 1995 ; Smith *et al.*, 1995) et module l'expression des différents sous-types de récepteurs du glutamate (Churchill *et al.*, 1999). L'interaction entre les neurotransmissions glutamatergique et dopaminergique sont importantes dans les mécanismes d'action de la cocaïne ; les projections que reçoivent le NAc et la VTA de la part du CPF ou de l'hypothalamus sont glutamatergiques. Des agonistes des récepteurs NMDA augmentent les propriétés renforçantes de la cocaïne et facilitent la rechute après sevrage (Cornish *et al.*, 1999), tandis que des antagonistes de ces récepteurs diminuent l'expression de gènes induits par la cocaïne (Jouvert *et al.*, 2002). Le système glutamatergique est notamment impliqué dans la sensibilisation comportementale (Kalivas *et al.*, 1993).

B-4-3 Les endocannabinoïdes

Le système endocannabinoïde joue un rôle modulateur dans le SNC. Les cannabinoïdes endogènes les mieux caractérisés sont l'anandamide et le 2-arachidonyleglycerol (2-AG) (Devane *et al.*, 1992). Ils se lient à deux récepteurs, CB1 et CB2, récepteurs métabotropiques couplés soit à une protéine Gs qui active une AC, soit à une protéine Gi/o qui l'inhibe (Wilson & Nicoll, 2002 ; Demuth & Molleman, 2006).

Dans le système mésocorticolimbique, les endocannabinoïdes agissent principalement, par le biais de récepteurs CB1, sur des interneurons GABAergiques (Maldonado *et al.*, 2006). Des études montrent que ces récepteurs participent à la réponse de l'organisme aux psychostimulants. Par exemple, des antagonistes limitent l'acquisition de la préférence de place à la cocaïne (Chaperon *et*

al., 1998) ou le comportement d'auto-administration de méthamphétamine (Vinklerova *et al.*, 2002). Toutefois, d'autres résultats indiquent que l'inactivation du gène CB1 chez la souris peut également diminuer l'auto-administration de cocaïne chez la souris (Soria *et al.*, 2005). En résumé, le système endocannabinoïde a un rôle modulateur dans le mode d'action des drogues.

B-4-4 Les opiacés endogènes

Comme les endocannabinoïdes, les opiacés endogènes ont une fonction régulatrice de l'activité neuronale. Trois types de récepteurs ont été identifiés : δ , κ et μ (Stefano *et al.*, 2000) ; il s'agit de récepteurs métabotropiques couplés à des protéines Gi/o qui inhibent une AC et réduisent donc l'activité neuronale. Les trois ligands endogènes de ces récepteurs se lient différemment aux trois types de récepteurs (Goldstein *et al.*, 1979 ; Grossman & Clement-Jones, 1983) : les dynorphines se lient préférentiellement aux récepteurs κ , les endorphines sont plus sélectives des récepteurs μ et les enképhalines se lient surtout aux récepteurs δ et μ . Ces opioïdes endogènes sont colibérés par des neurones utilisant des neurotransmetteurs classiques, le GABA en particulier.

Le fort pouvoir toxicomanogène des opiacés tels que l'héroïne ou la morphine indique un rôle important des opiacés endogènes dans les mécanismes sous-tendant la dépendance aux drogues. Des études lient le système opioïde à l'action de la cocaïne. Entre autres, la cocaïne augmente la libération d'endorphines mais réduit l'expression du gène codant le récepteur κ (Rosin *et al.*, 1999 ; Olive *et al.*, 2001). Des antagonistes des récepteurs κ et μ réduisent l'effet de la cocaïne dans des tests comportementaux (Corrigall & Coen, 1991 ; Skoubis & Maidment, 2003), mais des agonistes des mêmes récepteurs peuvent également diminuer l'auto-administration de cocaïne (Mello *et al.*, 1989).

C - Le système de récompense

C-1 Définition

Les connexions réciproques entre VTA, NAc, CPF et d'autres structures limbiques telles que l'amygdale constituent un réseau fonctionnel, hautement conservé. Ce circuit, mis à jour dès 1954 suite aux expériences d'auto-stimulation électrique menées sur le rat par Olds et Milner, est impliqué dans l'attribution d'une valeur appétitive aux renforçateurs positifs, dans l'intégration mémorielle de stimuli environnementaux prédictifs d'une récompense, et plus généralement dans la sélection d'un comportement tourné vers la recherche de cette récompense. Ce système est essentiel car il sous-tend des comportements nécessaires à la survie de l'individu ou de l'espèce tels que la recherche de nourriture ou la reproduction (Wise & Bozarth, 1985 ; Di Chiara & Imperato, 1988).

Le pic de DA mesurable dans le NAc suite à une expérience plaisante est communément considéré comme étant à la base des comportements de motivation, via le concept de « récompense ». Cette vision est remise en cause non seulement par des études indiquant un rôle plus large dans l'activation sensorimotrice et les comportements dirigés vers un but précis (« goal-directed behavior »), mais également par d'autres montrant que l'augmentation de DA extracellulaire peut aussi accompagner la présentation de stimuli aversifs (Salamone *et al.*, 1994 ; Ikemoto & Panksepp, 1999). La voie mésocorticolimbique est vue aujourd'hui plus volontiers comme un centre d'analyse et d'attribution des propriétés motivationnelles des stimuli (Berridge & Robinson, 1998). Enfin, des auteurs suggèrent un rôle de la DA mésocorticolimbique dans la prédiction de la récompense ; cette hypothèse se base sur l'observation de pics de DA suite à la présentation seule de stimuli associés à la drogue (Schultz, 2000). Par souci de simplicité, et parce qu'elle est encore très utilisée, nous garderons ici l'appellation de « système de récompense ».

C-2 Les structures du système de récompense

C-2-1 Aire tegmentale ventrale

La VTA correspond à l'aire A10 ; il s'agit d'une structure mésencéphalique dont sont issus des neurones dopaminergiques qui projettent principalement vers le NAc et le CPF, mais aussi vers le striatum dorsal, l'amygdale et les tubercules olfactifs (Koob & Volkow, 2010). La VTA est une structure centrale dans les effets renforçants des drogues : toutes les substances toxicomanogènes

agissent sur les neurones dopaminergiques qui la composent ou au niveau des synapses qu'ils forment, et potentialisent leur activité.

C-2-2 Noyau accumbens

Le NAc constitue une grande partie du striatum ventral. Il est composé de deux parties : la partie « core » (NAcC), entourée de la partie « shell » (NAcS) (Voorn *et al.*, 1989, Berendse *et al.*, 1992). Le NAcS fait partie du système limbique et, en tant que tel, participe plutôt au contrôle des processus émotionnels (Meredith, 1999). Le NAcC, proche du CPU, est impliqué dans la régulation des performances motrices et dans le conditionnement associé aux stimuli contextuels (Floresco *et al.*, 2008 ; Gremel & Cunningham, 2008). On le considère comme une interface entre les systèmes moteur et limbique (Mogenson *et al.*, 1980).

Le NAc reçoit des afférences dopaminergiques issues de la substance noire et de la VTA, et glutamatergiques issues du CPF, de l'hippocampe et de l'amygdale. Comme le reste du striatum, il est majoritairement composé de neurones GABAergiques particuliers, les neurones épineux de taille moyenne (medium spiny neurons, MSN) ; ces neurones libèrent également différents peptides. Le NAcC projette en retour vers la substance noire, tandis que le NAcS projette sur la VTA et le thalamus (Ikemoto, 2007). Les deux sous-régions projettent également sur le pallidum ventral.

C-2-3 Cortex préfrontal

On distingue trois régions au sein du CPF : le CPF latéral, le CPF médian (CPFm), et le cortex orbitofrontal. Le CPFm se divise en aires prélimbique, infralimbique, cingulaires antérieures Cg1 et Cg2, et frontale 1. Le CPF est la structure corticale la plus récente d'un point de vue évolutif (Jerison, 1994). Il est connecté, via des projections réciproques, à de nombreuses structures corticales et sous-corticales, du tronc cérébral au système limbique. Classiquement, ce sont ses connections avec le noyau médiodorsal du thalamus qui le définissent dans beaucoup d'espèces (Groenewegen, 1988).

Le CPF est impliqué dans les fonctions supérieures de représentation et de sélection pertinente des actions. Il reçoit des informations concernant le contexte environnemental, l'état émotionnel de l'individu, le niveau d'éveil, les motivations intrinsèque et extrinsèque, et organise l'exécution de l'action en conséquence (LeDoux, 1993 ; Fuster, 2001). Il est directement interconnecté aux autres aires corticales associatives, et indirectement aux aires motrices.

Les données sur les fonctions du CPF chez l'homme proviennent en partie de l'étude de lésions, le premier cas documenté étant celui de Phineas Gage, reporté par JM Harlow en 1868 (Macmillan, 2000), qui a suggéré un rôle du CPF dans le contrôle de l'impulsivité, l'inhibition de la prise de risque et la planification à long terme. Bien que les frontières fonctionnelles soient ténues entre les différentes sous-parties du CPF, ces aspects semblent plutôt dépendre du cortex orbitofrontal et du CPF latéral, tandis que le CPFm est plutôt impliqué dans des phénomènes attentionnels et d'initiation de l'action (Posner & Petersen, 1990 ; Cummings, 1993), mais également dans la mémorisation à long terme (Frankland & Bontempi, 2005).

De nombreuses études impliquent des dysfonctionnements du CPF dans la physiopathologie de l'addiction. Des similitudes comportementales existent en effet entre des personnes dépendantes et des patients présentant des lésions du CPF (Bechara & Van Der Linden, 2005). De même, des déficits fonctionnels sont observés dans le CPF de sujets cocaïnomanes, même après une période d'abstinence (Volkow *et al.*, 1991). Des lésions du CPFm favorisent l'auto-administration de cocaïne et dérèglent l'apprentissage de la contingence chez le rongeur, confirmant son rôle dans le contrôle inhibiteur de l'action et de l'impulsivité (Weissenborn *et al.*, 1997). Ces études ont mené à des hypothèses centrées sur le CPF dans l'étude de la dépendance (voir D-2-2).

C-2-4 L'amygdale

L'amygdale est composée de différents noyaux aux rôles fonctionnels distincts. Ne faisant pas partie du système mésocorticolimbique au sens strict, elle y est néanmoins associée. Le groupe de noyaux communément appelé amygdale baso-latérale (BLA), comprenant les noyaux latéral, basomédian, basal et basal accessoire, est impliqué dans l'association des stimuli environnementaux et de leurs propriétés renforçantes (Cador *et al.*, 1989 ; LeDoux, 2003). L'amygdale est également une structure cruciale dans les phénomènes de peur et d'anxiété (Damsa *et al.*, 2009). La présentation seule de stimuli associés à la cocaïne chez des sujets dépendants provoque une forte activation de l'amygdale (O'Brien *et al.*, 1998) ; la stimulation électrique de l'amygdale provoque la réinstauration du comportement de recherche de cocaïne chez le rat (Hayes *et al.*, 2003). L'amygdale jouerait donc un rôle important dans la rechute liée au stress et aux stimuli conditionnés.

D - La dépendance aux drogues

D-1 Définition, épidémiologie

D-1-1 Généralités

La dépendance aux drogues est aujourd'hui considérée comme une pathologie chronique caractérisée par une consommation compulsive ou une envie irrésistible de consommer la substance. Elle se développe progressivement et dépend de facteurs internes à l'individu (vulnérabilité individuelle, état émotionnel) et externes (type de drogue, mode de prise, fréquence et durée de l'exposition, contexte social). Après une prise de contact occasionnelle avec la substance, l'individu entre souvent dans une phase de consommation contrôlée. Chez certains, cette consommation devient abusive, en fréquence et/ou en quantité consommée ; parfois, elle mène à l'installation d'une dépendance. Ainsi, parmi les nombreux consommateurs réguliers de substances toxicomanogènes, seule une minorité développera une dépendance.

D-1-2 Critères du diagnostic

Le diagnostic de dépendance repose sur les critères du DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders ; American Psychiatric Association, 2000 ; Tableau 2) et de la CIM-10 (Classification statistique internationale des maladies et des problèmes de santé connexes ; Organisation Mondiale de la Santé, 1992), qui se recourent en grande partie.

| Tableau 2 : Critères de la dépendance selon le DSM-IV |
|--|
| Utilisation inadaptée d'une substance conduisant à une altération du fonctionnement ou à 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 : |
| <ol style="list-style-type: none"> 1. Tolérance, définie par l'un des symptômes suivants : <ul style="list-style-type: none"> - Besoin de quantités croissantes 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 : <ul style="list-style-type: none"> - Syndrome de sevrage caractéristique de la substance - Consommation de la substance (ou d'une substance proche) pour soulager ou éviter les symptômes de sevrage. 3. La substance est souvent prise en quantités plus importantes ou pendant une période plus longue que prévue. 4. Il y a un désir persistant de consommer la substance, ou des efforts infructueux pour diminuer ou contrôler l'utilisation de la substance. 5. Beaucoup de temps est passé à obtenir la substance, à consommer la substance, ou à récupérer de ses effets. 6. Des activités sociales, professionnelles ou de loisir sont abandonnées ou réduites à cause de l'utilisation de la substance. 7. L'utilisation de la substance est poursuivie bien que l'individu ait conscience d'avoir un problème psychologique ou physique persistant ou récurrent susceptible d'avoir été causé ou exacerbé par la substance. |
| <i>DSM-IV : Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders – IVth Revision (American Psychiatric Association, 2000)</i> |

Au delà des critères qui concernent les symptômes du sevrage ou le phénomène de tolérance (l'individu a besoin d'une dose plus importante pour obtenir les mêmes effets), beaucoup de ces critères correspondent à une conception de la dépendance basée essentiellement sur la perte de contrôle et sur le besoin compulsif : temps important passé à la recherche de la substance au détriment d'autres activités, efforts infructueux pour réduire sa consommation, maintien de la consommation malgré la connaissance des conséquences négatives qu'elle implique. Le désir persistant, impérieux, de consommer la substance correspond au concept de « craving ».

Pour être considéré comme dépendant, il faut présenter au moins trois des symptômes listés, sur une période d'un an. On comprend donc que, contrairement à ce que beaucoup pensent, le syndrome de sevrage n'est pas suffisant pour conclure à une dépendance.

D-2 Neurobiologie de la dépendance

D-2-1 Théories de la dépendance

Plusieurs théories ont été avancées pour expliquer la mise en place de la dépendance, se basant à la fois sur l'étude des patients et l'analyse des symptômes, et sur des travaux sur l'animal.

a) Renforcements positif et négatif

Selon ces théories, la drogue est d'abord consommée pour ses effets positifs, agréables (Wise, 1980). Les effets renforçants induisent une poursuite de la consommation qui rend apparents les effets négatifs du sevrage, aggravés par les phénomènes de tolérance. Le sevrage constitue alors un puissant renforçateur négatif qui maintient la consommation abusive (Koob & Bloom, 1988). Ce modèle peut expliquer l'initiation de la consommation de drogue et les premiers stades de sa maintenance, mais il trouve rapidement ses limites quand il est confronté aux phénomènes de « craving » et de rechute, qui sont présents même après la disparition du syndrome de sevrage. On note toutefois que l'intensité des symptômes du sevrage chez l'homme sont effectivement corrélés à l'échec de l'abstinence (Poling *et al.*, 2007 ; Kampman *et al.*, 2006).

b) Dérégulation homéostatique

Pour rendre compte de ces complexités, la théorie de la dérégulation de l'homéostasie hédonique se base sur le modèle des processus opposants (Solomon & Corbit, 1974). Selon ce modèle, toute modification d'un état est contrée par des processus opposés qui visent à rétablir l'état de base. Dans le cas de la drogue, l'application de cette théorie induit que des processus se mettent en place au sein du SNC avec pour objectif de réduire l'intensité des effets de la prise. La théorie de la dérégulation homéostatique, aussi appelée allostasie (Koob & Le Moal, 1997), propose un dérèglement du niveau hédonique lié à ces neuroadaptations, principalement celles se situant au sein du circuit cérébral du stress. Deux aspects composent cette théorie : d'une part, au fil des prises, l'amplitude de l'effet positif ressenti diminue, tandis que celle de l'effet négatif qui suit augmente, du fait d'une libération accrue de corticolibérine (Koob, 2008) ; d'autre part, les processus opposants mis en jeu ne ramènent pas le niveau hédonique au point homéostatique, mais à un niveau inférieur nommé point allostatique. Ainsi, au fur et à mesure des prises, l'humeur et l'état de bien-être de l'individu ne retournent à la normale qu'en présence de la substance d'abus. Cette dérégulation de l'homéostasie hédonique induirait l'installation de la dépendance.

c) Apprentissage procédural lié aux drogues

Différents travaux sur les projections dopaminergiques ont mené à l'établissement de théories basées sur l'apprentissage procédural. Dans ces théories, l'exposition répétée à la drogue provoque des neuroadaptations débouchant sur l'apprentissage d'une habitude de consommation, dans laquelle les stimuli associés déclenchent l'envie de consommer. Ainsi, la consommation de drogue passe d'un

processus conscient, maîtrisé, à un phénomène automatique (Hyman *et al.*, 2006 ; Robbins & Everitt, 1999). D'un point de vue anatomique, on observe une transition progressive du striatum ventral vers le striatum dorsal, et du striatum médian vers le striatum latéral, dans l'activité dopaminergique induite par la drogue, au fur et à mesure des prises (Everitt & Robbins, 2005 ; Hilario & Costa, 2008).

d) « Incentive sensitization » ou sensibilisation motivationnelle

La théorie de la sensibilisation motivationnelle, quant à elle, met en évidence la distinction entre l'aspect appétitif de la drogue, c'est-à-dire sa valeur hédonique (« liking »), et ses aspects motivationnels (« wanting »). Ainsi, le système dopaminergique serait à la base de l'attribution de la valeur motivationnelle à certains stimuli environnementaux, et ces processus seraient sensibilisés par les drogues (Berridge & Robinson, 1998). Selon ce modèle, la « salience » motivationnelle démesurée qui leur est alors attribuée, ainsi qu'aux stimuli associés, perturbe l'analyse motivationnelle nécessaire au choix des actions et induit chez le consommateur une envie compulsive, irrépressible, de consommer la drogue (notion de « craving »). Les modèles animaux de sensibilisation comportementale ont été considérés pour certains comme des tests d'étude de cette théorie.

D-2-2 Autres apports théoriques

a) Dysfonctionnement fronto-striatal

En plus de ces théories, de nombreux travaux indiquent que la consommation répétée de drogues perturbe le contrôle inhibiteur de l'action exercé par les cortex frontal et préfrontal. Ces systèmes frontocorticaux, et en particulier les projections striatofrontales, sont en effet impliqués dans les processus cognitifs supérieurs qui gouvernent la régulation des émotions et le choix des actions les plus adaptées au contexte et aux conséquences à long terme (Smith & Jonides, 1999 ; Bechara *et al.*, 2000 ; Davidson *et al.*, 2000). Or, l'exposition chronique à la drogue modifie le fonctionnement de ces réseaux. Par exemple, des changements métaboliques ont été démontrés dans le cortex frontal de sujets dépendants aux amphétamines ou à la cocaïne (Volkow *et al.*, 1991). Chez le rat, l'auto-administration de cocaïne provoque des anomalies structurales dans les dendrites des neurones pyramidaux du cortex préfrontal (Robinson *et al.*, 2001). Les dysfonctionnements dans les contrôles inhibiteurs, couplés à l'importance de plus en plus grande accordée à la drogue, mèneraient à sa consommation compulsive et à la dissociation cognitive nécessaire au maintien de

la consommation malgré la connaissance des conséquences négatives. Ces aspects rejoignent les études indiquant que le trait de caractère que représente l'impulsivité serait un facteur de vulnérabilité au développement de la dépendance (Perry & Carroll, 2008 ; Jentsch & Taylor, 1999).

b) Modifications de la plasticité synaptique

D'un point de vue mécanistique, différents travaux indiquent que les drogues modifient durablement l'activité synaptique. Les études sur la potentialisation et la dépression à long terme, LTP et LTD respectivement, deux phénomènes expérimentaux qui apparaissent suite à des protocoles de stimulation spécifiques, ont fourni de nombreuses pistes quant aux mécanismes de renforcement synaptique qui seraient à la base des modifications des circuits neuronaux liées à l'expérience (Bliss & Collingridge, 1993 ; Zhuo & Hawkins, 1995). Ces processus concernent également les structures du système de récompense, en particulier la VTA et le NAc (Thomas & Malenka, 2003).

Un nombre croissant de travaux démontre que les drogues modulent la force des synapses glutamatergiques des neurones dopaminergiques de la VTA, et ce, dès la première injection, selon un mécanisme similaire à la LTP (Ungless *et al.*, 2001 ; Faleiro *et al.*, 2004). Ces effets sont spécifiques aux substances susceptibles d'induire une dépendance (Saal *et al.*, 2003). Les drogues agissent également sur les synapses GABAergiques dans cette structure (Nugent & Kauer, 2008). La cocaïne, quant à elle, est en mesure d'agir au niveau du NAc selon des mécanismes proches de la LTD (Thomas *et al.*, 2001) et dans d'autres structures comme l'hippocampe (Yeoh *et al.*, 2012). Selon certains auteurs, ces mécanismes seraient cruciaux dans la sensibilisation des circuits neuronaux aux drogues et dans la mise en place de la dépendance (Thomas & Malenka, 2003). Ces approches rejoignent d'autres études sur les phénomènes de plasticité liée aux drogues et qui envisagent la dépendance comme une pathologie de la mémorisation (Lee & Dong, 2011).

D-3 Approches thérapeutiques

Les traitements pharmacologiques disponibles aujourd'hui contre la dépendance sont limités : le suivi des patients a pour objectif essentiel l'encadrement du sevrage et le maintien de l'abstinence. Les approches thérapeutiques sont encore plus réduites dans le cas de la cocaïne, notamment du fait qu'aucune molécule de substitution ne peut être proposée comme dans le cas des opiacés (Mendelson & Mello, 1996). Les traitements possibles présentent encore un taux important d'échec (De Lima *et al.*, 2002 ; Simpson *et al.*, 1999, 2002).

La prise en charge des patients doit d'abord répondre à la problématique du sevrage. Dans le cas des psychostimulants, les manifestations cliniques sont principalement des troubles de l'humeur, une importante dysphorie et une forte anxiété. Les benzodiazépines et les antidépresseurs sont alors les traitements les plus utilisés. Des substances modulant la neurotransmission noradrénergique, comme le propranolol (Kampman *et al.*, 2001), réduisent l'anxiété due au sevrage et favorisent l'abstinence.

Divers agents pharmacologiques utilisés en clinique pour d'autres pathologies ont montré des effets sur le sevrage, l'envie de consommer et/ou la consommation de cocaïne. Bien que les études cliniques soient encore en cours et que leur efficacité soit parfois discutable, ces composés sont parfois proposés comme pharmacothérapies contre la dépendance. C'est le cas par exemple du disulfiram, plus couramment utilisé contre l'alcoolodépendance, ou encore du topiramate, un anti-épileptique (Vocci & Elkashef, 2005).

Dans tous les cas, l'accompagnement psychologique du patient est une composante essentielle du suivi. Psychothérapie de soutien, psychothérapies cognitives et comportementales, groupes de parole facilitent la mise en place de l'abstinence et son maintien à long terme (Carroll *et al.*, 1998 ; Crits-Christoph *et al.*, 1999).

De nouvelles pistes thérapeutiques visent directement la molécule de cocaïne dans l'organisme ; il s'agit par exemple des approches utilisant des enzymes de dégradation ou des approches immunologiques. Les premières consistent en l'administration d'enzymes exogènes, en particulier des estérases de la cocaïne, qui accélèrent le catabolisme de la drogue (Gao *et al.*, 2009). L'approche immunologique a d'abord été développée pour les opiacés (Bonese *et al.*, 1974), puis abandonnée du fait du développement de traitements de substitution. Elle se base sur le développement d'agents injectables dont l'objectif est soit :

- de séquestrer la cocaïne par l'utilisation de vecteurs exprimant des anticorps spécifiques (Dickerson & Janda, 2005),
- de provoquer chez le sujet une réponse immunitaire dirigée contre la cocaïne (Bunce *et al.*, 2003).

Il s'agit donc de vaccins anti-cocaïne. Dans les deux cas le patient « immunisé » n'aurait donc plus qu'une sensibilité réduite aux effets de la cocaïne. Cette approche montre des résultats intéressants chez l'animal puisqu'elle réduit la quantité de cocaïne qui atteint le cerveau et la prise de drogue

(Kantak *et al.*, 2000 ; Carrera *et al.*, 2001). Elle vise principalement à aider à prévenir la rechute chez le patient abstinent en diminuant l'effet récompensant d'une prise éventuelle de drogue (Fox, 1997) ; des difficultés techniques chez l'homme et des questions éthiques restent encore à résoudre (Martell *et al.*, 2005, 2009 ; Hall & Gartner, 2011).

E - L'auto-administration de drogues chez le rongeur

E-1 Les modèles animaux dans l'étude des drogues

L'étude des mécanismes d'action des drogues comporte de nombreux outils méthodologiques, en particulier des tests comportementaux qui permettent de mettre en avant les différents aspects du comportement de consommation et de la perte de contrôle qui caractérise la dépendance.

E-1-1 Activité locomotrice et sensibilisation comportementale

Chez le rongeur, l'injection aiguë de psychostimulants produit une augmentation rapide et transitoire de l'activité locomotrice et exploratoire, et l'apparition de mouvements stéréotypés à de fortes doses (Witkin & Goldberg, 1990). Ces comportements facilement observables et mesurables constituent un premier indice de l'effet de ces drogues.

L'étude de la sensibilisation comportementale dérive de ces mesures et s'intéresse à leur évolution suite à un traitement chronique par la drogue. Ainsi, on sait qu'une dose constante de cocaïne injectée de manière répétée induit une augmentation progressive de l'hyperlocomotion observée lors de chaque injection (Kalivas *et al.*, 1988). Ce protocole a permis de mettre en évidence des modifications neurobiologiques à long terme, car la sensibilisation comportementale est persistante et peut s'exprimer plusieurs mois après la dernière injection. D'autre part, il a suggéré l'influence prépondérante de l'environnement dans la dépendance, car son acquisition et son expression sont très sensibles aux stimuli environnementaux (Anagnostaras & Robinson, 1996). Enfin, il fait apparaître la convergence de l'action des différentes substances toxicomanogènes dans l'apparition de sensibilisations croisées : un animal sensibilisé à la cocaïne exprimera une sensibilisation à la morphine ou aux amphétamines (Bonate *et al.*, 1997 ; Cunningham *et al.*, 1997). Ce test a servi de base à des théories de la dépendance centrées autour du concept d'une sensibilisation du système motivationnel (Robinson & Berridge, 1993), bien que sa pertinence dans la modélisation de la pathologie soit contestée.

E-1-2 Préférence de place conditionnée

Le test de préférence de place conditionnée (CPP) est le plus adéquat dans l'étude des propriétés appétitives d'une substance. Il permet d'évaluer la perception qu'a l'animal de la valeur intrinsèque d'une substance, et la force de la mémorisation de cette valeur (Sanchis-Segura &

Spanagel, 2006). En pratique, l'animal est placé dans une cage contenant deux compartiments qu'il peut facilement distinguer (couleurs, texture du sol, environnement olfactif). Il est d'abord libre d'explorer les compartiments, puis, dans une première étape, il est confiné dans l'un des compartiments après administration de la substance étudiée. Au cours de la session suivante, il est confiné dans l'autre compartiment après injection de la solution véhicule. Cette étape constitue le conditionnement. Dans la phase de mesure du test, enfin, l'animal est réintroduit dans la cage avec la possibilité d'aller librement d'un compartiment à l'autre, sans injection préalable de drogue. Sa préférence pour un compartiment donné, exprimée par un temps plus long passé dans ce compartiment par rapport à l'autre, rend compte des propriétés appétitives de la substance. L'expression de cette préférence peut être testée après une période longue, ce qui renseignera sur la force de la trace mnésique.

Toutes les substances toxicomanogènes induisent une CPP robuste chez le rongeur (Tzschentke, 2007). D'autres substances ou des comportements (rapports sexuels, prise de nourriture chez des animaux en privation) le font également (Martinez & Paredes, 2001 ; Schroeder & Packard, 2002). Le protocole de CPP peut aussi mettre en évidence les propriétés aversives d'un stimulus, on parle alors d'aversion de place conditionnée. C'est le cas pour le sevrage à une drogue, mais c'est également le cas pour certaines drogues à des doses élevées (nicotine, éthanol, Δ^9 -tétrahydrocannabinol) (Tzschentke, 2007).

E-2 L'auto-administration intraveineuse de cocaïne

Les tests discutés en E-1 présentent le biais de ne se baser que sur des injections de drogue réalisées par l'expérimentateur ; d'autre part, ils ne permettent pas d'étudier le renforcement comportemental induit par ces substances. L'auto-administration de drogue (AA) ne présente pas ces limites. Se rapprochant de la consommation de drogue chez l'homme, car c'est l'animal lui-même qui déclenche les injections, ce test met en évidence les propriétés renforçantes des drogues, définies comme la capacité d'augmenter la fréquence d'un comportement, c'est-à-dire l'appui sur un levier ou l'entrée du museau dans un orifice identifié. Le développement de ce paradigme a permis de mieux comprendre la mise en place de la dépendance, les vulnérabilités individuelles aux drogues ou encore la distinction entre recherche et prise de drogue.

L'auto-administration orale est principalement utilisée pour l'alcool ; nous nous focaliserons ici sur l'auto-administration intraveineuse, plus courante en ce qui concerne la cocaïne. En pratique,

un cathéter intraveineux est implanté dans la veine jugulaire du rat de manière à ce qu'il puisse s'auto-administrer de petites quantités de drogue. La présence d'un orifice (ou levier) inactif, permet de s'assurer de l'acquisition du comportement opérant de l'animal ; en général, les animaux discriminent fortement l'orifice ou le levier actif (Dworkin & Stairs, 2003).

L'AA permet de développer de nombreux protocoles, plus ou moins complexes, et donc de modéliser différents aspects de la prise de drogue et de la dépendance. Ainsi certaines procédures rendent compte de l'acquisition du comportement de consommation (LeSage *et al.*, 1999) ou de la motivation de l'animal à rechercher la substance (Caine *et al.*, 1993). Ces protocoles seront exposés dans la partie méthodologique de ce mémoire. L'impact du contexte environnemental ou de la compétition avec des renforçateurs naturels peut également être évalué. Enfin, l'AA permet l'étude du phénomène de rechute, qui se réfère chez l'animal à la réinstallation du comportement de recherche de drogue après une période de sevrage plus ou moins longue. Les études ont montré que ce comportement pouvait être activé par trois types de stimuli : une injection unique de la substance (on parle de « priming »), un stress léger, ou l'exposition à des indices environnementaux préalablement associés à la drogue (Shaham *et al.*, 2003).

La plupart des substances qui induisent une dépendance chez l'homme sont auto-administrées par l'animal. L'AA représente le test se rapprochant le plus de la consommation de drogue chez l'homme ; il peut être utilisé dans la construction de modélisations complexes qui rendent compte de l'installation ou du maintien de la dépendance en modélisant plus précisément des symptômes de la dépendance selon le DSM-IV (Deroche-Gamonet *et al.*, 2004 ; Vanderschuren & Everitt , 2004). Il est particulièrement adapté à l'évaluation de l'influence d'un traitement sur les effets à long terme de la drogue.

Partie II : Les régulations épigénétiques

A - Définitions

Le terme « épigénétique » a été introduit par Conrad Waddington en 1942 pour désigner « l'étude des relations de cause à effet entre les gènes et leurs produits, faisant apparaître le phénotype ». Cette vision, complémentaire à la génétique classique, permettait d'explorer les mécanismes qui font que des cellules au patrimoine génétique identique l'expriment de façon différentielle. Ainsi, pour beaucoup, si la génétique correspond à l' « écriture » du génome, l'épigénétique renvoie à sa « lecture ». Au fil du temps, la notion d'épigénétique a beaucoup évolué, intégrant dans son analyse le fait que la cellule évolue dans un environnement changeant, et que ces changements se répercutent sur l'expression des gènes. Aujourd'hui, l'épigénétique est définie comme l'étude des mécanismes, généralement réversibles, à la base des changements des états de la chromatine et régulant la transcription des gènes, héréditaires au cours des divisions cellulaires. Certains scientifiques ajoutent que ces mécanismes n'impliquent pas de modification de la séquence nucléotidique.

Les mécanismes épigénétiques ciblent la chromatine, ultrastructure formée de l'ADN (acide désoxyribonucléique) nucléaire associé à de petites protéines globulaires, les histones, et que nous présenterons en B-1. Les mécanismes consistent en un ensemble de processus interconnectés qui prennent pour cible l'ADN ou les histones. Parmi ces processus, nous détaillerons l'état de méthylation de l'ADN en B-2, et les modifications post-traductionnelles des histones, et en particulier leur acétylation, en B-3. D'autres mécanismes, tels que l'action des ARN interférants ou des facteurs de remodelage de la chromatine dépendant de l'ATP, ne seront pas traités ici.

Depuis leur découverte, les mécanismes épigénétiques ne cessent d'être impliqués dans de nouvelles fonctions physiologiques. Toutefois, nous n'illustrerons ici que leurs implications dans le fonctionnement du cerveau. L'épigénétique permet notamment de comprendre comment l'environnement de l'organisme, et donc de la cellule, peut influencer la plasticité cellulaire et inscrire des modifications à long terme. Nous aborderons ces aspects au niveau neuronal en C-1, ainsi que leurs conséquences sur l'étude de certaines pathologies neurologiques. Enfin, des études liant mécanismes épigénétiques et action des drogues, en particulier dans le cas de la cocaïne, seront présentées en C-2.

B - La chromatine et ses modifications

B-1 Organisation de la chromatine

Dans le noyau, l'ADN, siège de l'information génétique, est associé à des protéines très basiques, les histones, afin de former une ultrastructure à la conformation modulable, la chromatine. En effet, les contraintes spatiales nécessitent une compaction très importante de l'ADN, mais l'information génétique doit rester accessible à la transcription et à la copie, ce qui exige une régulation dynamique considérable.

La double hélice d'ADN s'enroule d'abord autour de groupements d'histones pour former des nucléosomes (Figure 11). La chromatine est donc organisée en une structure caractéristique en « collier de perles ». Dans un deuxième degré d'organisation, le nucléofilament s'enroule sur lui-même en une fibre solénoïde régulière de 30 nm de diamètre (McGhee & Felsenfeld, 1980). L'ancrage de la fibre de chromatine à la matrice nucléaire permet la formation de boucles d'ADN, ce qui constitue la forme peu condensée du chromosome, appelée euchromatine. C'est à ce degré de compaction que s'adressent certaines modifications épigénétiques.

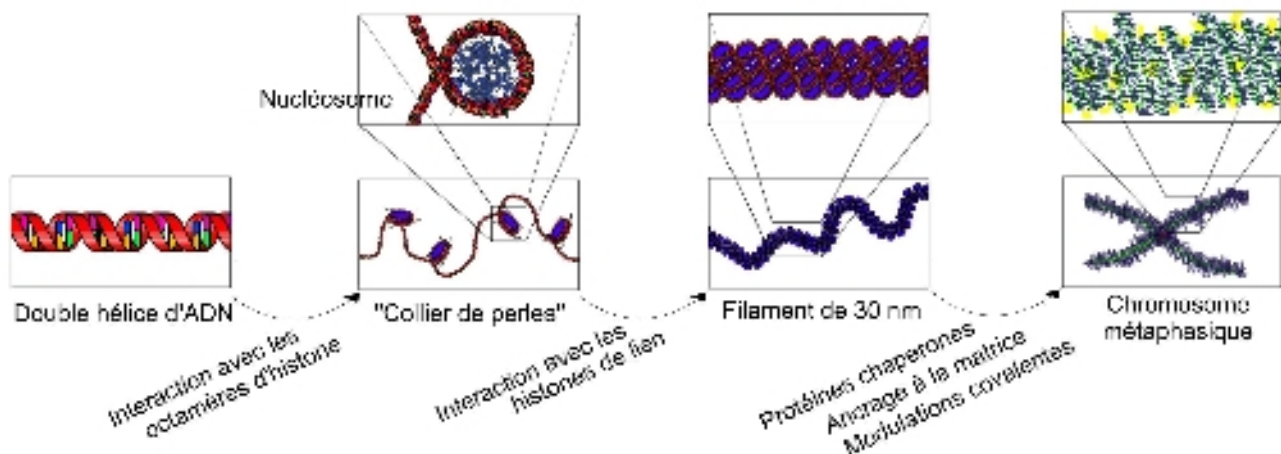


Figure 11 : États de compaction de la chromatine

Des régions chromosomiques se trouvent en un état plus condensé, l'hétérochromatine, dans lequel l'information génétique est inaccessible aux facteurs de transcription (Belmont *et al.*, 1999). C'est le cas notamment de domaines fonctionnels du chromosome comme les centromères et les télomères. Mais c'est aussi le cas de l'ensemble de la chromatine lors de la mitose. Ainsi, l'euchromatine, décondensée, est considérée comme la forme « active » de la chromatine alors que

l'hétérochromatine en est la forme « inactive », car sa compaction ne permet pas la transcription des gènes (Bártová *et al.*, 2008).

B-2 Histones et nucléosomes

Comme signalé plus haut, l'ADN nucléaire est associé à des regroupements de protéines particulières, les histones, pour former les nucléosomes (Figure 12). Entité fondamentale de la chromatine, le nucléosome se compose d'une partie centrale, le NCP (« nucleosome core particle »), et d'une région internucléosomale qui relie les particules entre elles. Le NCP contient 146 paires de base d'ADN enroulées autour d'un octamère d'histones. D'autres protéines participent à la formation et à la stabilité du nucléosome, en particulier les protéines dites « chaperones des histones » telles que Nap-1 (Hansen *et al.*, 2010) ; elles ne seront pas détaillées ici.

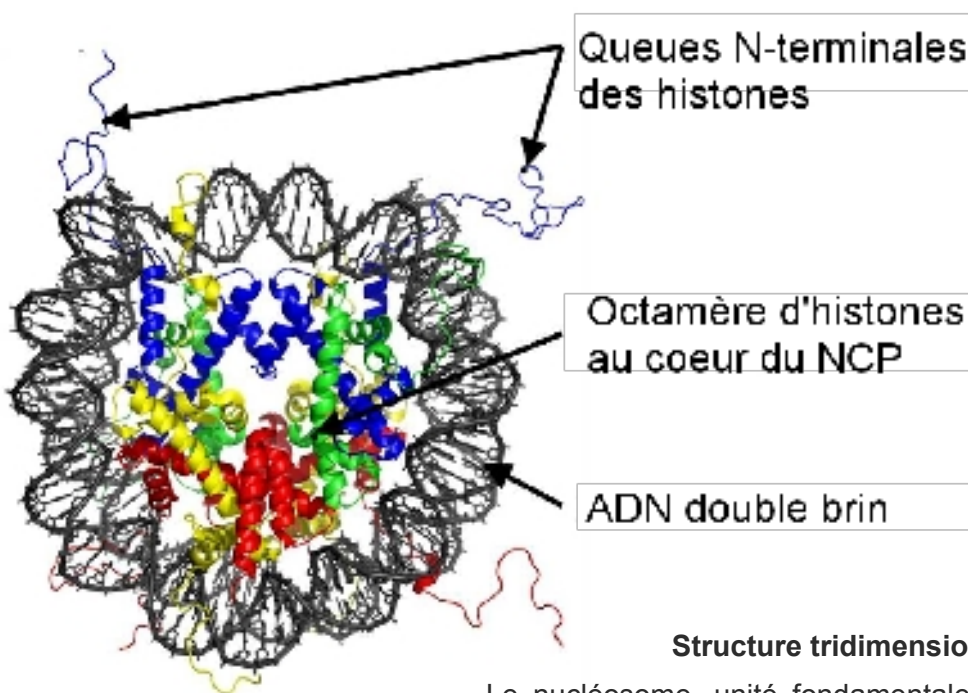


Figure 12 :
Structure tridimensionnelle du nucléosome

Le nucléosome, unité fondamentale de la chromatine, est constitué d'un octamère d'histones autour duquel s'enroule une longueur d'ADN de 146 paires de base.

NCP = nucleosome core particle ; Adapté de Luger et al., 1997

Les histones sont de petites protéines (11 à 22 kDa) qui possèdent toutes deux domaines distincts : un domaine C-terminal globulaire et une partie N-terminale, la « queue de l'histone ». Le domaine N-terminal est hydrophobe et formé de trois hélices α . Il est impliqué dans la dimérisation des histones, ce qui lui donne son nom de domaine « histone fold », mais il est également composé de plus de 20 % de résidus lysine et arginine, ce qui le rend très basique et permet la liaison à

l'ADN, dont le squelette phosphodiester est chargé négativement. Les extrémités N-terminales des histones pointent vers l'extérieur du nucléosome ; elles participent à l'intégrité structurale du nucléosome et à la compaction de la chromatine, et certaines sont le lieu de modifications covalentes post-traductionnelles qui modifient leur fonction (Luger & Richmond, 1998).

Le NCP se forme autour d'un octamère d'histones comprenant 2 exemplaires des histones H2A, H2B, H3 et H4. Plus précisément, les histones sont organisées dans le cœur du nucléosome en un tétramère (H3-H4)₂ associé à deux dimères H2A-H2B (Akey & Luger, 2003). Les histones H1 et H5 se trouvent au niveau des régions internucléosomales (10 à 80 paires de base) et servent d'« histones de liaison » (linker histones), assurant la stabilité de l'ADN reliant les nucléosomes (Blank & Becker, 1995). Toutes ces histones, en dehors de H4, existent sous différentes isoformes, codées par des gènes différents (Franklin & Zweidler, 1977), qui sont appelées « variants ». Ont été ainsi identifiés onze variants pour l'histone H1, seize pour H2A, quatorze pour H2B et douze pour H3 (Lindner, 2008 ; Happel & Doenecke, 2009). Ces variants ont des particularités spécifiques, et leur substitution dynamique constitue un premier mécanisme épigénétique que nous ne détaillerons pas ici (Hake & Allis, 2006 ; Jin *et al.*, 2005).

B-3 La méthylation de l'ADN

B-3-1 Mécanismes

La méthylation de l'ADN est la régulation épigénétique fondamentale, que l'on retrouve de la bactérie aux mammifères, avec toutefois des variations dans la base méthylée. Chez les vertébrés, elle consiste en l'ajout d'un groupement méthyle sur le carbone 5 de la cytosine dans le dinucléotide CpG (Figure 13).

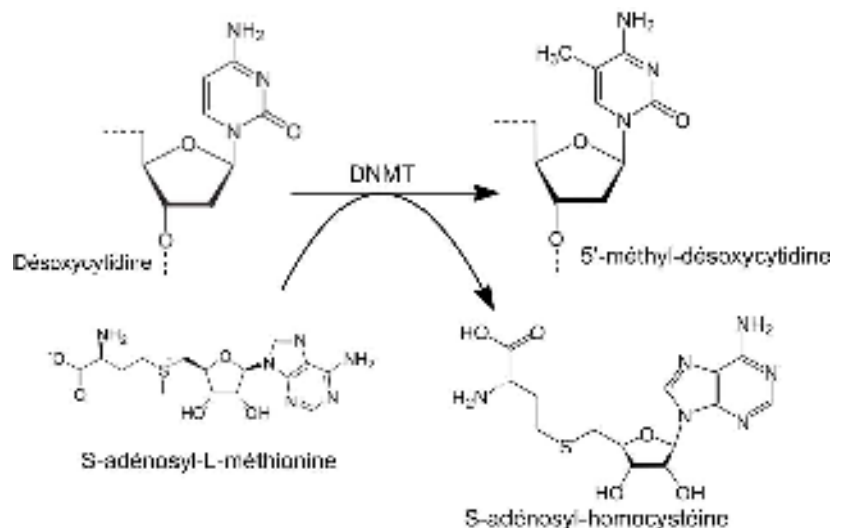


Figure 13 : Méthylation de l'ADN

DNMT : méthyltransférase de l'ADN

Les nucléotides CpG sont enrichis au niveau des régions régulatrices 5' des gènes. Ces séquences, appelées « îlots CpG », ont pour caractéristique de contenir au moins 200 paires de base, au moins 50 % de CpG, et un rapport CpG observés / CpG attendus d'au moins 0,6 (Gardiner-Garden & Frommer, 1987). Bien que riches en CpG, ces îlots sont souvent hypométhylés (Deaton & Bird, 2011).

La méthylation de l'ADN est assurée par les méthyltransférases de l'ADN (DNMT), enzymes réparties en 3 familles. La DNMT₁ présente une affinité plus grande pour l'ADN double brin semi-méthylé, ce qui lui permet d'assurer le maintien des profils de méthylation au cours de la réplication de l'ADN ; elle est donc considérée comme la méthyltransférase de maintenance (Qin *et al.*, 2011). À l'inverse, les DNMT_{3A} et 3B assurent la méthylation de novo des CpG. La DNMT₂, identifiée par homologie de séquence avec la DNMT₁, est peu étudiée car elle présente une activité enzymatique très faible (Hermann *et al.*, 2004). Notons qu'aucune enzyme qui assurerait la déméthylation des CpG méthylés n'a encore été réellement identifiée, bien que certaines protéines aient été proposées comme possédant une activité déméthylase (Bhattachaya *et al.*, 1999 ; Barreto *et al.*, 2007). Toutefois ces résultats sont fortement controversés. Des données récentes indiquent que la déméthylation est assurée par un processus en deux étapes : l'oxydation de la méthyl-cytosine en hydroxyméthyl-cytosine (hmC), catalysée par des enzymes de la famille TET (« ten-eleven translocation »), suivie par l'intervention d'enzymes de réparation de l'ADN, telles que les BER (« base excision repair glycosylases ») (Bhutani *et al.*, 2011).

En général, la méthylation de l'ADN résulte en l'inhibition de la transcription du gène correspondant (Cedar, 1988). Elle est essentielle à la stabilité et à l'intégrité du génome, notamment par sa répression de régions discrètes, hyperméthylées, telles que l'ADN répétitif, issu de rétrovirus, ou encore des transposons (Bestor, 2000). Mais elle permet également la régulation dynamique de l'expression des gènes sous l'influence de l'environnement. Cette activité de répression de la transcription découle, d'une part, de la prévention de la liaison de facteurs de transcription aux régions promotrices, et d'autre part, du recrutement de protéines spécifiques possédant des domaines de liaison à l'ADN méthylé (MBD), qui recrutent à leur tour d'autres protéines jouant un rôle dans la compaction de la chromatine (Robertson, 2002).

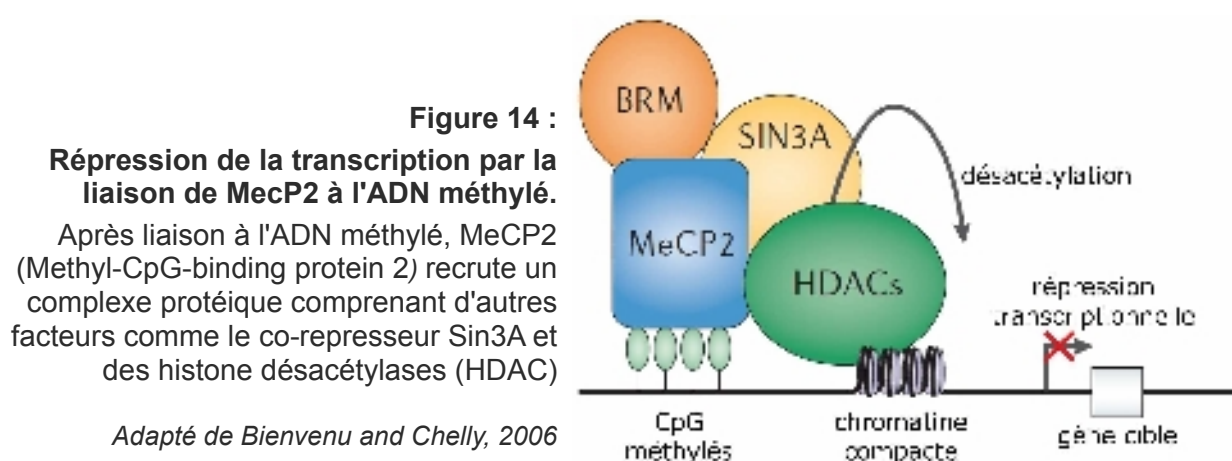
Le rôle essentiel de la méthylation de l'ADN et des phénomènes associés a été mis en évidence dans l'apparition de pathologies dues à leurs dérèglements. C'est le cas des cancers, où l'on

peut dans certains cas observer une inversion des taux de méthylation entre régions normalement peu ou très marquées par la modification. Ces changements moléculaires prennent place très tôt parmi les dérèglements en jeu dans la transformation des cellules (Baylin *et al.*, 2001 ; Jones & Laird 1999 ; Robertson, 2001). Un autre exemple est l'ICF (« Immunodeficiency, centromere instability, facial anomalies »), maladie génétique rare découlant de mutations au niveau du gène codant la DNMT3b (Smeets *et al.*, 1994 ; Franceschini *et al.*, 1995).

B-3-2 Les protéines de liaison à l'ADN méthylé

La protéine nucléaire MeCP2 (methyl-CpG-binding protein 2) fut la première protéine identifiée comme étant en mesure de se lier à l'ADN méthylé (Lewis *et al.*, 1992 ; Nan *et al.*, 1997). À partir de sa structure fut déterminé le domaine impliqué dans cette interaction, nommée MBD, ce qui permit d'identifier d'autres protéines présentant ce motif. Ainsi, en plus de MeCP2, on distingue 4 familles de protéines à MBD, les protéines MBD1 à MBD4.

La liaison de MeCP2 à des promoteurs méthylés réprime la transcription des gènes concernés *in vitro* et *in vivo* (Kaludov & Wolffe, 2000). Cette activité est portée par un domaine de répression de la transcription, TRD, qui recrute un complexe protéique contenant entre autres le co-répresseur transcriptionnel Sin3 et des histone désacétylases (HDAC, voir B-4) (Nan *et al.*, 1998 ; Jones *et al.*, 1998). Cette interaction représente le lien fonctionnel entre méthylation de l'ADN, modification de la chromatine et répression transcriptionnelle (Figure 14).



D'autres protéines à MBD agissent également en recrutant des complexes protéiques capables d'agir sur la structure de la chromatine. Ainsi MBD2 appartient au complexe MeCP1, qui contient,

entre autres, les HDAC1 et 2, et MBD3 recrute le complexe Mi-2/NuRD (« nucleosome remodeling and deacetylation ») qui possède une activité de remodelage du nucléosome (Nan *et al.*, 1997 ; Zhang *et al.*, 1999). MBD1 interagit également avec des HDAC, mais avec la spécificité de pouvoir aussi cibler des séquences d'ADN peu méthylées (Fujita *et al.*, 2000). Enfin, malgré son homologie de structure avec MeCP2, la protéine MBD4 a un rôle fonctionnel apparemment différent. Il ne s'agit pas d'une protéine de liaison à l'ADN à proprement parler, et elle participe sans doute à des mécanismes de réparation de l'ADN par une activité glycosylase de la thymine (Hendrich *et al.*, 2000).

Le rôle essentiel de ces protéines est mis en évidence dans plusieurs pathologies. C'est le cas du syndrome de Rett, maladie génétique neurodéveloppementale qui touche environ une fille sur 14 000, et qui est associée à une mutation du gène MeCP2 (Amir *et al.*, 1999). Ce syndrome est caractérisé par l'apparition tardive (vers 18 mois), mais progressive, de perturbations des fonctions cognitives et de la motricité, pouvant s'accompagner de convulsions et d'anomalies respiratoires (Chahrour & Zoghbi, 2007). L'étude de son étiologie, complétée par des modèles génétiques chez la souris, a démontré que la protéine MeCP2 a une fonction primordiale dans l'activité synaptique et la maturation neuronale (Banerjee *et al.*, 2012).

B-4 Les modifications post-traductionnelles des histones

Les modifications covalentes visant l'extrémité N-terminale des histones constituent un deuxième groupe essentiel de marqueurs épigénétiques. Ces mécanismes concernent principalement les histones du cœur du nucléosome. Contrairement à la méthylation de l'ADN qui représente un processus plus stable, les modifications des histones, réversibles, permettent des régulations plus dynamiques. Parmi ces modifications, les mieux caractérisées sont l'acétylation, la méthylation et la phosphorylation. D'autres ont été mises en évidence, telles que l'ubiquitinylation, la SUMOylation, l'ADP-ribosylation, la biotinylation, la déimination ou encore la glycoxydation, mais on sait peu de choses à leur sujet et elles ne seront pas détaillées ici. Toutes ces modifications covalentes sont catalysées par des enzymes spécifiques, qui ciblent des résidus déterminés (Tableau 3 ; Kouzarides, 2007).

| Modification | Enzyme | H1 | H2A | H2B | H3 | H4 |
|------------------|--|--------------------------------|---------------------------|-------------------|---|-----------------------|
| Acétylation | Histone acétyltransférases / désacétylases | K25 | K5, K9, K13 | K5, K12, K15, K20 | K4, K9, K14, K18, K23, K27, K56 | K5, K8, K12, K16, K20 |
| Méthylation | Histone méthyltransférases / déméthylases | K25 | | | K4, K9, K27, K36, K79, K122, R2, R8, R17, R26, R128, R129 | K20, R3 |
| Phosphorylation | Protéine kinases / phosphatases | S17, S26, T10, T17 | S1, T120 | S14, S33 | S10, S28, T3, T11 | S1 |
| Ubiquitinylation | Complexe E1, E2, E3 / Isopeptidases | | K119 | K120 | | |
| SUMOylation | Complexe E1, E2, E3 / Isopeptidases | | K126 | K6, K7, K16, K17 | ? | ? |
| ADP-ribosylation | ADP-ribosyltransférases, Sirtuines / Glycohydrolases | E2, E15, E114, E115, E117, R33 | E2 | E ou R | E ou R | E ou R |
| Biotinylation | Holocarboxylases, biotinidases | | K9, K13, K125, K127, K129 | | K4, K9, K18 | K8, K12 |
| Déimination | Peptidylarginine deiminase 4 | | | | R2, R8, R17, R26 | |
| Glycoxydation | Pas d'enzyme | K | K | K | | K |

E = glutamate ; K = lysine ; R = arginine ; S = sérine ; T = thréonine

B-4-1 Acétylation

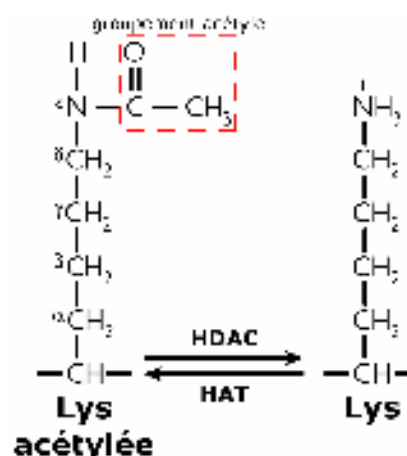
a) Mécanisme

La première démonstration d'un lien entre acétylation des histones et niveau d'expression génique date de 1964 (Allfrey *et al.*, 1964). Cette modification consiste en un transfert de groupement acétyle issu de l'acétyl-coenzyme A vers le groupement ϵ -aminé d'un résidu lysine (Figure 15). L'acétylation de l'extrémité N-terminale d'une histone mène généralement à l'activation de la transcription. Cet effet découle de la modification conformationnelle de la chromatine induite par la diminution de charge de la lysine acétylée, mais également du recrutement de protéines régulatrices qui modifient ou stabilisent la structure du nucléosome. L'ADN est relâché, ce qui permet son accessibilité aux facteurs de transcription. Parmi les protéines interagissant avec les

histones acétylées, on trouve notamment celles présentant un bromodomaine (Kouzarides, 2000). Même si l'acétylation concerne l'ensemble des histones, histones de liaison comprises, elle est plus fréquente chez les histones H3 et H4.

Figure 15 :
Acétylation des histones sur un résidu lysine

HAT = acétyltransférase des histones ;
HDAC = désacétylase des histones



Le niveau d'acétylation est régulé par deux types d'enzymes aux activités opposées : les histone acétyltransférases (HAT) et les histone désacétylases (HDAC). Les HDAC sont les plus étudiées, en particulier du fait de nombreuses applications thérapeutiques potentielles. En effet on leur connaît de nombreux inhibiteurs, qui sont actuellement testés dans des pathologies aussi diverses que le cancer, les maladies infectieuses et parasitaires, ou les déficiences cardiovasculaires (Ma *et al.*, 2009 ; Andrews *et al.*, 2012 ; Wightman, 2012 ; McKinsey, 2012).

b) Les histone acétyltransférases

Comme leur nom l'indique, les histone acétyltransférase, ou HAT, catalysent l'acétylation des histones. On distingue les HAT de type A, nucléaires, qui sont en charge de l'acétylation des histones nucléosomales, et les HAT de type B, cytoplasmiques, qui acétylent les histones H4 et H3 libres, néo-synthétisées (Parthun, 2007). Les HAT de type A se répartissent en trois familles principales : la famille MYST, la famille GNAT (« GCN5-related N-acetyltransférases ») et la famille contenant les protéines de liaison au facteur CREB (cAMP response element binding protein), CBP/p300 (Hodawadekar & Marmorstein, 2007).

Il faut noter que la plupart des HAT ont également comme substrats des protéines autres que des histones. Elles régulent ainsi l'activité d'autres protéines liées à l'ADN comme des facteurs de transcription (Masumi, 2011), mais également de protéines non nucléaires, en particulier l' α -

tubuline, ou encore de protéines que l'on retrouve aussi bien dans le cytoplasme que dans le noyau, telles que l'importine- α (Bannister et al., 2000).

c) Les histone désacétylases

Les histone désacétylases, ou HDAC, catalysent la réaction opposée à celle des HAT, soit l'hydrolyse du groupement méthyle des résidus lysine. Cette activité est donc généralement la cause d'une transcription diminuée. On recense dix-huit HDAC chez l'homme, réparties en quatre classes selon leur homologie de structure avec les HDAC de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, selon leur localisation cellulaire ou selon leur spécificité de substrat (de Ruijter et al., 2003).

Les HDAC de classe I, comprenant les HDAC 1, 2, 3 et 8, sont nucléaires, ubiquitaires, et leur structure est proche de celle de Rpd3 chez la levure. Elles sont de petite taille (350 à 500 acides aminés) et leur activité est régulée par phosphorylation par la caséine kinase II ou par la PKA (Renthal & Nestler, 2009). HDAC1 et HDAC2 s'associent *in vivo* à de grands complexes protéiques tels que Sin3A-Sin3B, NuRD ou Co-REST (Denslow & Wade, 2007). Parmi les protéines associées, on trouve des DNMT ou des histone méthyltransférases formant des complexes répresseurs de la transcription (Fuks *et al.*, 2001). HDAC3 fait partie de complexes comprenant aussi N-COR ou SMRT (Guenther *et al.*, 2001), et elle présente la particularité de posséder un signal d'exportation nucléaire. À l'instar des HAT, les HDAC de classe I peuvent exercer leur activité catalytique sur d'autres protéines que les histones, comme des facteurs de transcription (p53, STAT3) ou encore des récepteurs nucléaires (récepteurs des androgènes et des oestrogènes) (Glozak *et al.*, 2005).

Les HDAC de classe IIa (HDAC 4, 5, 7 et 9) et IIb (HDAC 6 et 10) sont de plus grande taille et proches de l'enzyme Hda1 de la levure. Elles ont une expression plus discrète que celle des HDAC de classe I ; les enzymes de la sous-classe IIa sont plutôt exprimées dans le cœur, les muscles squelettiques et le cerveau, et celles de la sous-classe IIb se situent préférentiellement dans le cœur, les reins et le foie (Verdin *et al.*, 2003). Les HDAC de la classe II possèdent à la fois un signal de localisation nucléaire (NLS) et un signal d'exportation nucléaire. Elles traversent ainsi les pores nucléaires, d'où une localisation à la fois cytoplasmique et nucléaire (Grozinger & Schreiber, 2000). Ce processus est régulé par phosphorylation au niveau d'un résidu sérine : une fois phosphorylée, l'enzyme interagit avec une protéine 14-3-3 qui se lie au domaine NLS et la transporte vers le cytoplasme en bloquant son importation nucléaire ; sa déphosphorylation la conduit à nouveau vers le compartiment nucléaire. Parmi les kinases responsables de sa phosphorylation, on trouve des kinases inductibles par le sodium (SIK1), le calcium (CaMKII), ou

des kinases sous le contrôle d'autres voies de signalisation (Linseman *et al.*, 2003 ; van der Linden *et al.*, 2007). Ainsi l'activité des HDAC de classe II est gouvernée par des stimuli environnementaux qui déterminent sa localisation cellulaire (McKinsey *et al.*, 2000). Enfin, ces HDAC interagissent avec les facteurs de transcription de la famille MEF2 (« myocyte enhancer factor 2 ») (Miska *et al.*, 1999) ; l'induction de MEF2C par la cocaïne passe ainsi par la phosphorylation de HDAC5 (Dietrich *et al.*, 2011).

Les HDAC des classes I et II ainsi que HDAC11, seule représentante de la classe IV, sont toutes des métalloprotéines nécessitant un ion zinc comme cofacteur, contrairement aux HDAC de la classe III, les sirtuines, qui utilisent le dinucléotide nicotinamide adénine NAD⁺ comme cofacteur (Porcu & Chiarugi, 2005). Cette classe III des HDAC est une classe à part, sans homologie de structure avec les autres classes et proche de la protéine Sir2 de la levure ; les enzymes qui la composent sont au nombre de sept, nommées SIRT1 à 7 (Imai *et al.*, 2000, Haigis & Sinclair, 2010). Certaines sirtuines sont mitochondriales (SIRT 3 à 5), ce qui leur confère un rôle dans le métabolisme ; d'autres ont comme substrats préférentiels des protéines intervenant dans la transcription telles que p53, CBP/p300 ou NF- κ B (Saunders & Verdin, 2007).

B-4-2 Méthylation

La méthylation des histones porte aussi bien sur des résidus lysine qu'arginine, et consiste en un transfert du groupement méthyle issu d'une molécule de S-adénosyl-L-méthionine vers le groupement ϵ -aminé du résidu (Zhang & Reinberg, 2001). Les résidus lysine peuvent donc être mono-, di- ou triméthylés (Akbarian & Huang, 2009). Contrairement à l'acétylation qui induit généralement une baisse de la transcription, la méthylation des histones peut avoir un effet activateur ou répresseur selon le résidu concerné et le degré de méthylation. Ces effets passent par le recrutement de protéines régulatrices pour lesquelles les résidus méthylés représentent des sites de fixation (« docking sites ») (Li *et al.*, 2007). La méthylation est la modification covalente des histones pour laquelle on trouve le plus de domaines de reconnaissance protéiques.

Trois familles d'histone méthyltransférases (HMT) catalysent cette réaction (Kouzarides, 2002, 2007). On dénombre ainsi plus de dix arginine-méthyltransférases, subdivisées en quatre classes (type I à IV) selon qu'elles catalysent une diméthylation asymétrique ou symétrique. Les protéines méthylant les résidus lysine sont également réparties en quatre classes (SET1, SET2, RTZ et SUV39). La troisième famille d'HMT contient des enzymes associées aux membranes. Les histone déméthylases, qui catalysent la réaction opposée, sont moins bien caractérisées. Les

enzymes identifiées présentent des spécificités vis-à-vis du résidu, mais également du degré de méthylation (Allis *et al.*, 2007 ; Lan *et al.*, 2008).

B-4-3 Phosphorylation

La phosphorylation des histones se fait par le transfert d'un groupement phosphate de l'ATP principalement sur des résidus sérine et thréonine. Seules les kinases MSK1 et 2 (« mitogen- and stress-activated kinases ») ont été trouvées associées aux histones ; l'activité de ces kinases est régulée par les MAP kinase ERK 1 et 2 ou p38 kinase (Thomson *et al.*, 1999). Plusieurs sérine/thréonine protéine phosphatases (PPase) sont impliquées dans la déphosphorylation des histones : PP1, PP2A et PP4 (Nakada *et al.*, 2008 ; Nowak & Corces, 2004).

La phosphorylation des histones est un processus important dans l'activation de la transcription, mais également dans l'apoptose (Rogakou *et al.*, 2000), la réparation de l'ADN (Rogakou *et al.*, 1998) ou encore la condensation des chromosomes lors de la mitose (Koshland & Strunnikov, 1996). D'autre part, les différentes modifications covalentes des histones ne sont pas indépendantes les unes des autres : ainsi la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 facilite l'acétylation subséquente de résidus voisins par le recrutement d'HAT, un processus appelé « phosphoacétylation » (Walter *et al.*, 2008, Winter *et al.*, 2008).

C - Implications fonctionnelles des mécanismes épigénétiques dans le cerveau

C-1 Epigénétique, influence de l'environnement et plasticité neuronale

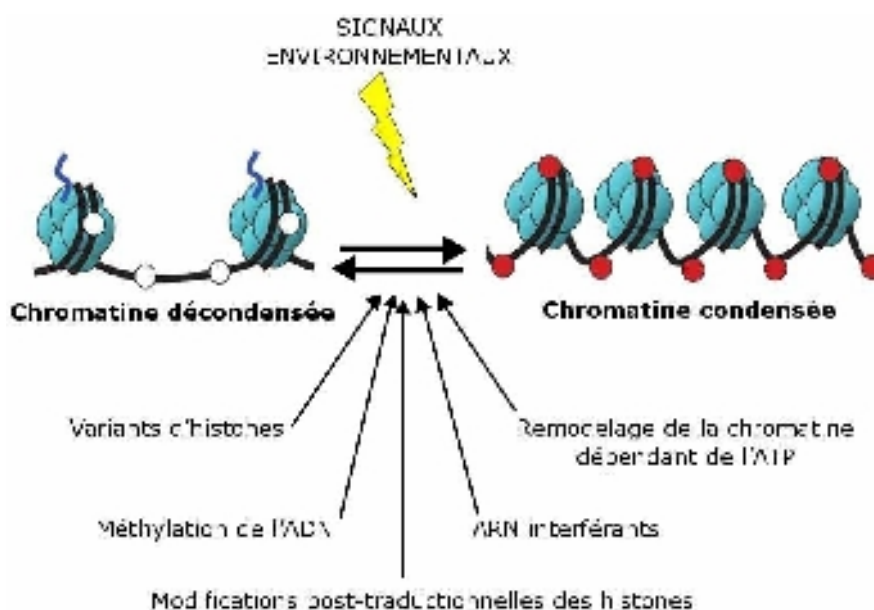


Figure 16 : Influence de l'environnement sur la structure de la chromatine

Les régulations épigénétiques médient la transition entre chromatine condensée et décondensée sous l'influence de signaux environnementaux. La condensation de la chromatine inhibe la transcription des gènes.

Les régulations épigénétiques représentent des pistes séduisantes dans la compréhension du lien entre facteurs environnementaux et adaptations durables de la cellule et de l'organisme. Leurs caractéristiques à la fois dynamiques et stables permettent d'envisager des mécanismes inscrivant à long terme l'influence du contexte et de l'expérience sur l'expression des gènes (Figure 16).

De nombreuses données expérimentales ont mis en évidence l'influence de l'environnement sur les régulations épigénétiques. Ainsi, des animaux à génome identique, ou, chez l'homme, des jumeaux monozygotes, présentent souvent des différences phénotypiques marquées, au niveau du comportement ou de la susceptibilité à certaines pathologies, entre autres. Ces variations ont été corrélées à des différences dans les profils de méthylation (Cibelli *et al.*, 2002 ; Tamashiro *et al.*, 2003 ; Fraga *et al.*, 2005). De la même façon, des expériences traumatiques vécues dans l'enfance peuvent influencer le comportement à l'âge adulte via la machinerie épigénétique. Chez le rongeur,

cet aspect est illustré par le modèle de la privation maternelle qui démontre que les régions promotrices des gènes codant les récepteurs des glucocorticoïdes présentent une hyperméthylation et une hypoacétylation des histones chez des rats privés de soins maternels durant les premières semaines de vie. Ces modulations sont corrélés à une sensibilité accrue au stress à l'âge adulte (Weaver *et al.*, 2004 ; Champagne *et al.*, 2006). Des résultats similaires ont été mis en évidence chez l'homme (McGowan *et al.*, 2009).

D'autre part, la manipulation des marqueurs épigénétiques est en mesure d'interférer avec les capacités mnésiques, comme le montre, entre autres, l'effet de l'inhibition de l'HAT CBP dans différentes tâches d'apprentissage (Alarcón *et al.*, 2004 ; Korzus *et al.*, 2004). D'autres équipes ont montré que soumettre des rats à un test de peur conditionnée augmente l'acétylation des histones H3 dans l'hippocampe des animaux (Levenson *et al.*, 2004). Ces études fournissent de nombreux indices impliquant des régulations épigénétiques dans les phénomènes de plasticité synaptique persistante que sont la potentialisation et la dépression à long terme (LTP et LTD). Ainsi, elles démontrent que l'inhibition des HDAC facilitent la potentialisation synaptique, l'opposé étant observé pour une réduction de l'activité HAT.

L'importance des mécanismes épigénétiques dans le développement et le bon fonctionnement du système nerveux est évident si l'on considère les pathologies issues de dysfonctionnements dans leur régulation. C'est le cas des syndromes de Rett et ICF, que nous avons abordés en B-3-2 et qui découlent de mutations dans des gènes codant des protéines régulant le taux de méthylation de l'ADN. D'autres pathologies neurologiques sont dues à des dérèglements dans l'acétylation des histones, comme le syndrome de Rubinstein-Taybi (Tsankova *et al.*, 2007). Des études post-mortem de cerveaux de patients et des modèles animaux ont également conduit à établir des hypothèses épigénétiques dans la mise en place de la dépression (Tsankova *et al.*, 2006), ou encore de la schizophrénie (Labrie *et al.*, 2012 ; Petronis *et al.*, 1999). Ces hypothèses permettent de comprendre les composantes environnementales, acquises, de ces pathologies, et ouvrent de nouvelles pistes thérapeutiques (Kubota *et al.*, 2012).

| Maladie | Origine | Phénotype |
|------------------------------|--|--|
| Syndrome d'Angelman | Empreinte anormale par méthylation de l'ADN du chromosome maternel 15q11-13 | Atrophie corticale, démyélinisation du cervelet, problèmes cognitifs |
| Syndrome de Coffin-Lowry | Mutation du gène RSK2 dont la protéine interagit avec MeCP2, CBP | Maladie liée à l'X, retard psychomoteur, problèmes squelettiques et craniofaciaux |
| Syndrome de l'ICF | Mutation du gène codant DNMT _{3b} | Immunodéficience, anomalies faciales, retard mental et moteur |
| Syndrome de Prader-Willi | Empreinte anormale par méthylation de l'ADN du chromosome maternel 15q11- 13 | Léger retard mental, problèmes endocriniens |
| Syndrome de Rett | Mutation du gène codant MECP2 | Maladie liée à l'X, arrêt du développement cérébral, problèmes cognitifs, comportement autistique |
| Syndrome de Rubinstein-Taybi | Mutation du gène codant CBP | Retard mental, caractéristiques faciales anormales, arrêt de la croissance |
| Syndrome du X fragile | Hyperméthylation des promoteurs des gènes codant FMR1 et FMR2 | Maladie liée à l'X, comportement autistique, macrocéphalie, visage étroit et allongé avec de grandes oreilles, hypotonie |

CBP : Protéine de liaison au facteur CREB ; ICF : Immunodeficiency, centromere instability, facial anomalies ; MeCP2 : Methyl-CpG-binding protein 2

C-2 Modifications épigénétiques et mode d'action des drogues

La dépendance chez l'homme est sous-tendue par des mécanismes à long terme, qui expliquent à la fois l'évolution de la réponse de l'organisme à la substance (tolérance et sensibilisation), le passage progressif d'un usage contrôlé à un usage compulsif, le maintien de l'envie de consommer en absence de drogue, et la possibilité permanente de rechute, même après des années d'abstinence totale. Les substances toxicomanogènes sont donc en mesure de modifier durablement le fonctionnement cérébral, mais les mécanismes précis mis en jeu restent encore à déterminer. Les régulations épigénétiques sont de bons candidats pour participer à de tels processus, car aucun autre mécanisme de la transcription ne présente une demi-vie compatible avec les phénomènes se déroulant dans la mise en place de la dépendance. Depuis quelques années, les preuves expérimentales de l'implication du remodelage de la chromatine dans l'action des drogues s'accumulent. Ces études indiquent que les substances toxicomanogènes modulent des protéines

impliquées dans les régulations épigénétiques, et qu'à l'inverse la manipulation pharmacologique de ces protéines peut moduler l'effet des drogues.

Ainsi, les niveaux d'acétylation des histones sont modifiées dans différentes structures cérébrales du système de récompense du rongeur après un traitement aigu ou chronique par la cocaïne (Kumar *et al.*, 2005 ; Renthall *et al.*, 2009 ; Cassel *et al.*, 2006) ou par l'alcool (Pandey *et al.*, 2008). On trouve également des modifications des niveaux d'acétylation sur certains promoteurs au cours du sevrage (Pandey *et al.*, 2008, Freeman *et al.*, 2008). Les inhibiteurs des HDAC sont en mesure de modifier la réponse à la cocaïne dans différents modèles, bien que le sens de ces modifications soit parfois contrastée. Cette action est observable dans plusieurs tests comportementaux : hyperlocomotion et sensibilisation comportementale (Li *et al.*, 2005 ; Kumar *et al.*, 2005, Romieu *et al.*, 2008), préférence de place conditionnée (Kumar *et al.*, 2005 ; Renthall *et al.*, 2007 ; Schroeder *et al.*, 2008), ou encore auto-administration (Romieu *et al.*, 2008 ; Sun *et al.*, 2008, Host *et al.*, 2010 ; Wang *et al.*, 2010). L'inhibition des HDAC a été impliquée dans l'action d'autres drogues comme les amphétamines ou l'alcool (Wong *et al.*, 2011). Des modifications covalentes des histones autres que l'acétylation sont également modulées par les drogues, en particulier la méthylation (Maze *et al.*, 2010).

Des données lient aussi la méthylation de l'ADN à l'effet des drogues. Une étude de notre laboratoire démontre ainsi, en 2006, qu'un traitement chronique par la cocaïne induit l'expression des protéines de liaison à l'ADN méthylé MeCP2 et MBD1 dans les neurones du CPFm et du striatum (Cassel *et al.*, 2006). Ce résultat a depuis été confirmé par de nombreuses études qui indiquent des modulations de la méthylation de l'ADN de certains promoteurs et/ou des DNMT par la cocaïne (Carouge *et al.*, 2010 ; LaPlant *et al.*, 2010), l'alcool (Marutha Ravindran & Ticku, 2004), ou encore la nicotine (Satta *et al.*, 2008).

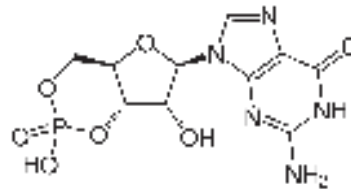
Pour confirmer la portée de ces études réalisées chez le rongeur, on peut préciser que des résultats mettent également en cause les régulations épigénétiques dans la mise en place de la dépendance chez l'homme. Ainsi, on sait que les profils de méthylation diffèrent chez des patients alcoolodépendants ou héroïnomanes ; des études ont par exemple montré chez certains une hyperméthylation au niveau des promoteurs des gènes du DAT (Hillemacher, 2009) et du récepteur μ des opiacés (Nielsen *et al.*, 2009).

Partie III : La voie du GMP cyclique

A - Le GMP cyclique

Peu de temps après la découverte de l'AMP cyclique (cAMP), l'existence de la guanosine 3'-5'-monophosphate cyclique (cGMP, Figure 17) fut mise en évidence dans de nombreux tissus (Schultz *et al.* 1969). L'attribution du prix Nobel de médecine à Furchgott, Ignarro, et Murad en 1998 pour l'identification du monoxyde d'azote NO - qui active la synthèse de cGMP - comme molécule de signalisation amena un regain d'intérêt pour le nucléotide.

Figure 17 :
Structure du GMP cyclique



Le cGMP est un second messager intracellulaire impliqué dans de nombreuses fonctions physiologiques. Il est formé à partir de GTP sous l'action des guanylate cyclases (GC), qui peuvent être solubles ou associées aux membranes. Les GC membranaires principales, GC-A et GC-B, sont activées par une famille de peptides, les peptides natriurétiques, que nous présenterons en B-1. La GC soluble est quant à elle stimulée par les gaz solubles, et en particulier par le NO ; elle sera l'objet de la partie B-2. D'autres GC membranaires ont été caractérisées mais ne seront pas traitées dans ce mémoire.

Une fois synthétisé, le cGMP agit sur différents types de cible. L'essentiel de son action passe par l'activation de la protéine kinase dépendante du cGMP, la PKG, dont les caractéristiques et les substrats seront détaillés en C-1. Des canaux cationiques sont également régulés par le nucléotide et seront rapidement introduits en C-2. Enfin, la famille des phosphodiesterases des nucléotides cycliques (PDE) contient à la fois des effecteurs du cGMP et les enzymes responsables de son hydrolyse. Ces enzymes seront traitées en partie C-3.

Plusieurs aspects du signal cGMP méritent d'être abordés. Ainsi, cAMP et cGMP présentent des régulations réciproques qui seront présentées en partie D. D'autre part, l'organisation du signal que représente le cGMP permet des régulations différentielles selon la source du nucléotide et selon le compartiment cellulaire envisagé, phénomène abordé en partie E. L'implication de la voie du cGMP dans le mode d'action des drogues sera abordée en F.

B - La synthèse du GMP cyclique

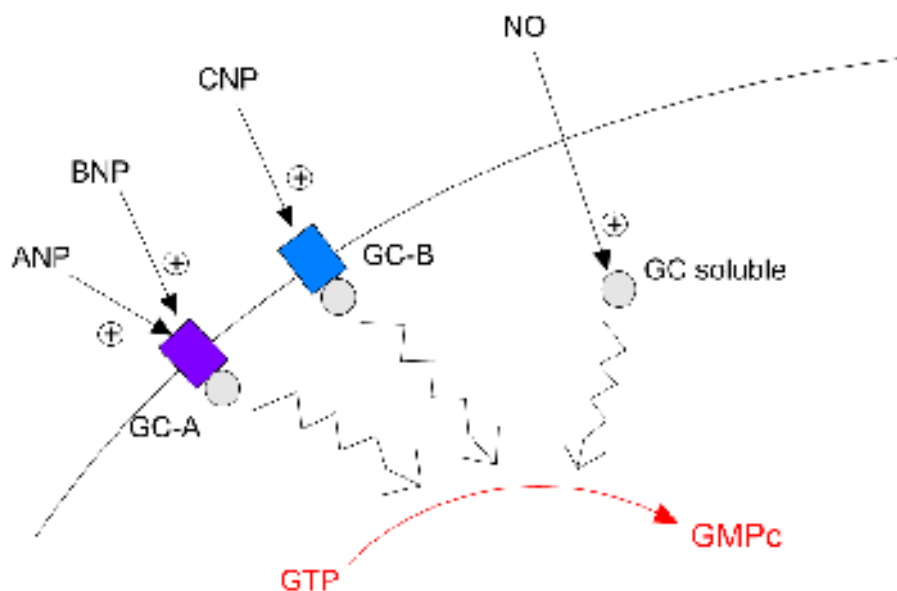


Figure 18 : Voies de synthèse du GMP cyclique

Le cGMP est synthétisé à partir de la guanosine triphosphate GTP sous l'action des guanylate cyclases (GC). Celles-ci sont activées par les peptides natriurétiques ANP, BNP et CNP, ou par le monoxyde d'azote NO

ANP, BNP, CNP = peptides natriurétiques atrial, « brain-derived », et de type C

B-1 Les peptides natriurétiques et leurs récepteurs à activité guanylate cyclasique

B-1-1 La famille des peptides natriurétiques

Les peptides natriurétiques ont été identifiés dans les années 1980. Le premier fut découvert en tant que peptide issu du cœur ayant une action sur la pression artérielle via les sécrétions rénales, et nommé en conséquence « atrial natriuretic peptide », ou ANP (de Bold *et al.*, 1981). Ce peptide de 28 acides aminés est libéré par les granules des oreillettes cardiaques en cas de distension (Rosenzweig & Seidman, 1991). Peu après, un peptide associé fut identifié dans des extraits de cerveau de porc, et nommé « brain-derived natriuretic peptide », ou BNP (Sudoh *et al.*, 1988). Toutefois, sa localisation est principalement cardiaque (Mukoyama *et al.*, 1991). Le peptide natriurétique de type C, ou CNP, fut le dernier à être découvert (Sudoh *et al.*, 1990).

Les 3 peptides sont issus de gènes distincts, avec une faible homologie de séquence. Leur transcription aboutit à la formation de préprohormones, d'abord clivées en prohormones. Les peptides finaux présentent des similitudes au niveau de leurs structures, en particulier une boucle de 17 acides aminés qui résulte de la formation d'un pont disulfure entre deux résidus cystéine (Figure 19). Les peptides ANP et BNP possèdent en outre deux extensions, tandis que le CNP n'en possède qu'une. Ainsi le CNP est plus court : 22 acides aminés contre 26 et 32 acides aminés pour l'ANP et le BNP.

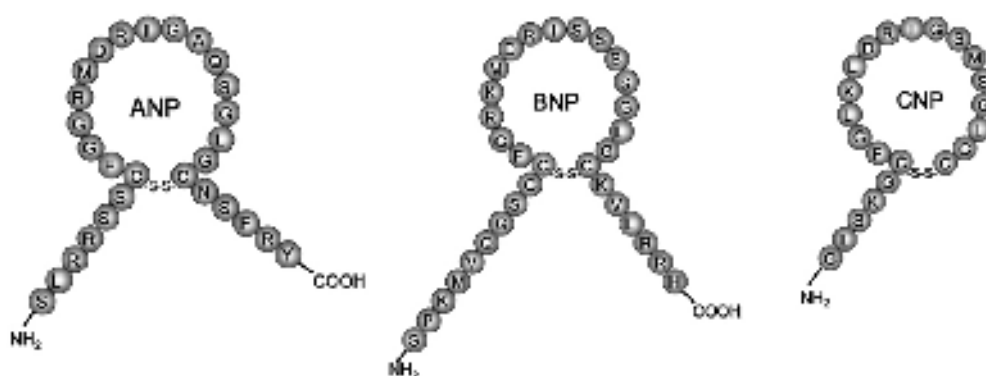


Figure 19 : Structure des peptides natriurétiques humains

Adapté de Lee et al., 2011

Les peptides natriurétiques ont une demi-vie plasmatique de 1 à 3 minutes, dans le cas de l'ANP et du CNP, ou de 20 minutes dans le cas du BNP. Ils sont dégradés par des endopeptidases neutres (NEP) (Vanneste *et al.*, 1988) ; leur taux est également régulé via l'internalisation de l'un de leurs récepteurs.

B-1-2 Les récepteurs des peptides natriurétiques

Les peptides natriurétiques exercent leur action par l'activation de récepteurs membranaires spécifiques. Ces récepteurs portent différents noms selon que l'accent est mis sur leurs ligands ou sur leur activité de type guanylate cyclase ; on parle ainsi de NPR pour « récepteurs des peptides natriurétiques », ou de GC pour « guanylate cyclases », respectivement.

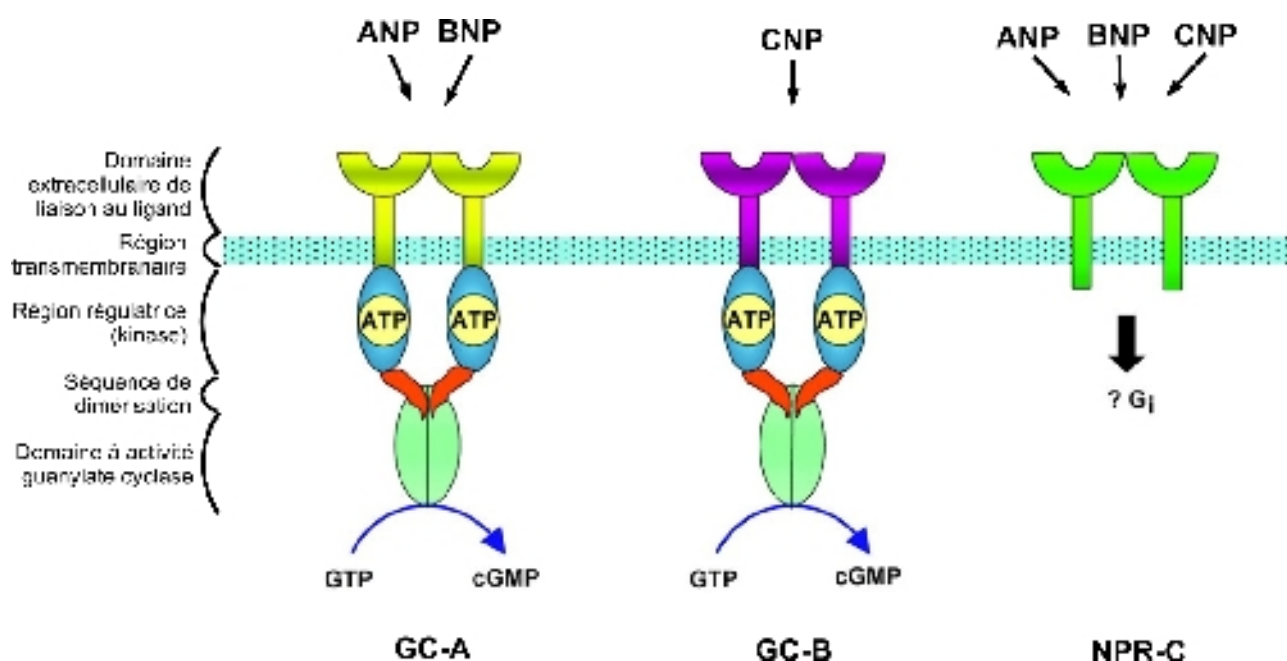


Figure 20 : Structure des récepteurs des peptides natriurétiques

ANP, BNP, CNP = peptide natriurétique atrial, « brain-derived » et de type C ;
 GC = guanylate cyclase ; NPR = récepteur des peptides natriurétiques
 Adapté de Gardner et al., 2007

Les deux récepteurs principaux des peptides natriurétiques possèdent une activité GC (Kuno *et al.* 1986). La GC-A a une plus grande affinité pour l'ANP et le BNP, tandis que la GC-B lie préférentiellement le CNP. Ces deux récepteurs présentent un large domaine extracellulaire de liaison au ligand, une région transmembranaire d'environ 20 résidus, et un domaine intracellulaire constitué d'une région d'auto-régulation à activité de type protéine kinase, d'une séquence de dimérisation, et d'une région N-terminale à activité GC (Hardman & Sutherland, 1969 ; Lucas *et al.*, 2000). Ils existent sous forme d'homodimère ou d'homotétramère (Iwata *et al.*, 1991). La phosphorylation est essentielle à leur activation, et leur déphosphorylation constitue un mécanisme de désensibilisation en cas d'exposition prolongée au ligand ou en réponse à des événements cellulaires, par le biais de la PKC (Potter & Garbers, 1994). La liaison du ligand à leur domaine extracellulaire déclenche la synthèse de cGMP.

Le troisième récepteur des peptides natriurétiques identifié, le NPR-C, ne possède pas d'activité GC. Sa capacité à lier efficacement les trois formes de peptides natriurétiques, combinée au phénomène d'internalisation-destruction auquel il est soumis l'ont longtemps fait percevoir comme un régulateur des taux de peptides natriurétiques circulants (Koh *et al.*, 1992 ; Nussenzveig *et al.*, 1990). Néanmoins des études plus récentes indiquent qu'il possède une activité propre liée à

une protéine Gi. Il est ainsi couplé à l'inhibition d'une AC et à l'activation de la PLC (Rose & Giles, 2008). Il est également en mesure d'inhiber une activité MAP kinase (Anand-Srivastava, 2005).

B-1-3 Localisation et fonctions des peptides natriurétiques et de leurs récepteurs

a) Effets somatiques

Le BNP est principalement sécrété par les ventricules cardiaques (Mukoyama *et al.*, 1991). À l'inverse, le CNP est trouvé au niveau de l'endothélium des vaisseaux sanguins, et il est plus abondant dans le système nerveux (Yandle, 1994 ; Chen & Burnett 1998). L'ANP, quant à lui, peut être détecté aussi bien au niveau du cœur que du cerveau. Les récepteurs GC-A, GC-B, NPR-C ou leurs messagers sont exprimés au niveau du rein, des poumons, du cœur, des vaisseaux sanguins, et du cerveau. On trouve aussi la GC-A dans les testicules, le tissu adipeux et les glandes adrénales. En outre, la GC-B est détectable dans les fibroblastes, le foie et l'utérus (Wilcox *et al.*, 1991 ; Nagase *et al.*, 1997).

L'ANP et le BNP sont connus pour leur action sur le système cardiovasculaire et la physiologie rénale. Ils agissent en tant qu'agents paracrines dans la régulation du débit sanguin par augmentation de la natriurèse et de la diurèse, vasorelaxation et antagonisme du système rénine-angiotensine (Kishimoto *et al.*, 1996 ; Lopez *et al.*, 1997). Ils jouent également un rôle autocrine dans le contrôle du volume cardiaque (Knowles *et al.*, 2001). Le CNP participe aussi à ces phénomènes, par son effet vasodilatateur sur l'endothélium vasculaire. La mesure des niveaux de peptides natriurétiques peut servir chez l'homme d'outil diagnostique en cardiologie (Daniels & Maisel, 2006). Le système des peptides natriurétiques fournit des pistes thérapeutiques dans le traitement des pathologies cardiovasculaires (Potter *et al.*, 2009).

Le système CNP/GC-B est également impliqué dans la croissance osseuse, rôle mis à jour par le développement de souris « knock-out » (KO) pour les gènes correspondant, et dont le phénotype principal est une taille réduite due à un défaut d'ossification endochondriale (Chusho *et al.*, 2001). L'injection de CNP permet de traiter la dysplasie squelettale chez le rongeur (Yasoda *et al.*, 2009)

b) Action sur le système nerveux

Dans le cerveau, l'ANP est principalement localisé dans l'hypothalamus au niveau des noyaux impliqués dans la régulation des fonctions endocrines et autonomes tel que le noyau arqué et les noyaux paraventriculaires ; on le trouve également dans l'amygdale, l'habenula, et l'hippocampe

(Kawata *et al.*, 1985 ; Saper *et al.*, 1985). Son messager est détectable dans les cortex entorhinal, périrhinal, piriforme et cingulaire (Langub *et al.*, 1995). L'expression de son récepteur, la GC-A, est plus réduite et se situe principalement dans les cellules mitrales du bulbe olfactif, l'habenula et l'area postrema. D'autre part, des données suggèrent qu'il est surtout exprimé par les cellules gliales (Herman *et al.*, 1996), et qu'il pourrait servir de messager extracellulaire de ces cellules (Parpura & Zorec, 2010).

Le CNP est quant à lui le peptide natriurétique prédominant dans les structures cérébrales. Son messager a été détecté dans l'hippocampe, l'amygdale, la substance noire et l'aire tegmentale ventrale, le cervelet, le noyau arqué, mais aussi dans les cortex entorhinal, périrhinal et piriforme (Langub *et al.*, 1995). Son récepteur, la GC-B, est largement réparti dans le cerveau, avec notamment un haut niveau d'expression dans le cortex, le bulbe olfactif, l'hippocampe et l'amygdale, mais aussi dans la substance noire et la VTA, dans leurs structures de projection striatales et au niveau des noyaux du tronc cérébral (Herman *et al.*, 1996 ; Thiriet *et al.*, 2001).

Le rôle le plus documenté des peptides natriurétiques au niveau central est leur effet sur la libération d'hormones et de neurotransmetteurs. En effet, leur localisation hypothalamique leur permet de moduler la libération d'hormones par l'hypophyse, pour une régulation rapide de la pression sanguine (Standaert *et al.*, 1987). Selon le type cellulaire, ils influent également sur l'exocytose des catécholamines (Debinski *et al.*, 1987 ; Kadowaki *et al.*, 1992). En particulier, le CNP est en mesure de réduire la libération de dopamine induite par la cocaïne (Thiriet *et al.*, 2001).

Le CNP joue également un rôle dans la croissance et le guidage des neurones sensoriels périphériques (Kishimoto *et al.*, 2008 ; Schmidt *et al.*, 2009). Il est impliqué dans la neurogénèse et la maturation cérébrale périnatales, comme le démontrent les problèmes neurologiques observés chez les souris KO pour la GC-B (Müller *et al.*, 2009 ; Zhao & Ma, 2009). Certains auteurs le considèrent comme un facteur de croissance neuronal (Waschek, 2004). De la même manière, le CNP et l'ANP présentent des propriétés neuroprotectrices dans certains contextes (Ma *et al.*, 2010 ; Wiggins *et al.*, 2003).

Dans le cerveau adulte, le CNP peut moduler les oscillations thalamocorticales impliquées dans le stockage de l'information et la consolidation de la mémoire (Decker *et al.*, 2009). L'ANP a aussi un rôle dans les fonctions mnésiques, comme mis en évidence dans un test d'évitement (Bidzseranova *et al.*, 1992). Le CNP possède des propriétés anxiolytiques, qui sont inhibées par un prétraitement bloquant les récepteurs dopaminergiques D2 (Biró *et al.*, 1996).

B-2 Le monoxyde d'azote et la guanylate cyclase soluble

B-2-1 Caractérisation

Il existe une forme cytosolique de guanylate cyclase, la GC soluble ou sGC, présente dans presque toutes les cellules de mammifères et dans beaucoup d'autres organismes. Elle se présente sous la forme d'un hétérodimère composé d'une sous-unité α de 73 kDa et d'une sous-unité β de 70 kDa (Kamisaki *et al.*, 1986). L'activité GC liée au NO est portée par deux isoformes principales, sGC1, hétérodimère $\alpha1\beta1$, et sGC2, hétérodimère $\alpha2\beta1$. Leurs contributions respectives sont mal connues, mais des souris KO pour les deux isoformes ont révélé des rôles différents, notamment dans la LTP (Mergia *et al.*, 2009). Chaque sous-unité possède un domaine N-terminal régulateur et un domaine C-terminal qui porte l'activité catalytique GC et se rapproche en séquence de celui des GC membranaires (Chinkers *et al.*, 1989 ; Thorpe & Morkin, 1990).

La sGC possède également un groupement hème qui permet la fixation de radicaux ; son ligand principal est le monoxyde d'azote NO (Garbers *et al.*, 1994). La sGC peut être transférée dans les membranes selon un mécanisme lié au calcium (Agulló *et al.*, 2005). Dans le cerveau, son ARNm est exprimé au niveau de l'hippocampe, du striatum, du système olfactif, des colliculi inférieur et supérieur, du cervelet, du locus coeruleus, ainsi que dans certaines couches du cortex (Matsuoka *et al.*, 1992). Toutefois, des études semblent restreindre la présence de la protéine à l'hippocampe seul (Burette *et al.*, 2002 ; Szabadits *et al.*, 2007).

Le NO est un messager qui diffuse librement à travers les membranes cellulaires, ce qui l'implique dans de nombreuses fonctions cellulaires et physiologiques. Il est généré lors de la conversion de la L-arginine en L-citrulline par les NO synthétases (« nitric oxide synthase », NOS). On distingue plusieurs types de NOS : la eNOS et la nNOS, détectées respectivement dans les cellules endothéliales et dans les neurones, sont exprimées de manière constitutives et sont stimulées par l'augmentation de calcium intracellulaire ; il existe aussi une NOS inductible, indépendante du calcium, la iNOS (Garthwaite & Boulton, 1995).

B-2-2 Fonctions

Le NO est impliqué dans de nombreux phénomènes : inhibition de l'aggrégation plaquettaire, tonus vasculaire et pression sanguine, motilité gastrointestinale, fonction pulmonaire ou encore défense immunitaire. Toutefois, l'enthousiasme qu'a suscité le NO en neurobiologie est lié à sa

capacité d'agir comme messenger rétrograde dans la synapse, et à sa participation subséquente aux phénomènes de plasticité synaptique de type LTP (Garthwaite *et al.* 1988 ; O'Dell *et al.*, 1991; Schuman & Madison, 1991). Schématiquement, dans les synapses concernées, l'activation du neurone postsynaptique induit la libération de NO qui passe les membranes et agit sur la sGC présynaptique. Il y a donc coïncidence, lors de l'arrivée ultérieure d'un signal, entre des activations pré- et postsynaptique, mécanisme à la base de la potentialisation synaptique. Il a ainsi été démontré que le NO est essentiel à la plasticité synaptique dans l'hippocampe (Taqatqeh *et al.*, 2009), dans le cortex visuel (Haghikia *et al.*, 2007) ou encore dans les synapses GABAergiques de la VTA (Nugent & Krauer, 2008). La diminution de la LTP induite par des inhibiteurs des NOS est contrecarrée par des analogues du cGMP, ce qui indique que l'action du NO dans ces formes de plasticité synaptique passe bien par la synthèse du nucléotide (Haley *et al.*, 1992).

Dans le SNC, le NO agit également sur la libération d'hormones ou de neurotransmetteurs. Ainsi, dans le CPU, le NO induit l'augmentation des libérations de glutamate, de GABA, d'acétylcholine et de sérotonine, mais inhibe la transmission dopaminergique induite par l'activation des récepteurs NMDA (Guevara-Guzman *et al.*, 1994). Dans d'autres modèles cellulaires le NO facilite la libération de cathécholamines (Oset-Gasque *et al.* 1994). Il est aussi mis en cause dans l'excitotoxicité liée aux récepteurs NMDA du glutamate (Dawson *et al.*, 1993).

La voie NO/sCG/cGMP module également des facteurs de transcription ; elle induit par exemple l'expression du gène c-fos via la phosphorylation de CREB (Chan *et al.*, 2004 ; Gallo & Iadecola, 2011). Notons qu'une partie des effets du NO sont indépendants de la formation de cGMP. En effet, en tant que radical, il est très réactif et peut induire la transformation de composants cellulaires (oxydation, nitrosylation ou nitration), avec des conséquences fonctionnelles souvent considérables (Guix *et al.* 2005). Entre autres, une partie de ses effets sur l'expression des gènes, qui passent par des mécanismes épigénétiques, seraient indépendants du cGMP (Illi *et al.*, 2009).

C - Les cibles du GMP cyclique

Les effets du cGMP sont portés par trois catégories de protéines. Tout d'abord, l'essentiel de son action passe par l'activation des protéine kinases dépendantes du cGMP (PKG). Certaines phosphodiesterases des nucléotides cycliques (PDE) sont également des cibles du nucléotide, tandis que d'autres mettent fin à son action par hydrolyse. Enfin, des canaux cationiques peuvent être régulés directement par les taux de cGMP.

C-1 Les protéine kinases dépendantes du GMP cyclique

C-1-1 Caractérisation et localisation

Les PKG sont des sérine/thréonine kinases exprimées par la plupart des organismes vivants. Chez les mammifères, deux gènes distincts codent deux enzymes présentant 50 % d'homologie : le gène *prkg1* code la PKG-I tandis que *prkg2* code la PKG-II (Wernet *et al.*, 1989 ; Uhler, 1993). La partie N-terminale de la PKG-I est codée par deux exons alternatifs qui produisent deux isoformes : la PKG-I α et la PKG-I β (Ruth *et al.*, 1991).

Les PKG se présentent toutes sous forme d'homodimères (Vaandrager *et al.*, 1997). Chaque monomère est composé de trois domaines fonctionnels : une extrémité N-terminale régulatrice, un domaine central de liaison au cGMP, et une extrémité C-terminale catalytique (Lohmann *et al.*, 1997). Le domaine N-terminal contient le motif « glissière à leucine » qui assure la dimérisation de l'enzyme, mais il présente aussi des sites d'auto-phosphorylation et une région pseudo-substrat ; l'ensemble exerce une régulation auto-inhibitrice sur l'enzyme. Le domaine central contient deux sites de liaison au cGMP qui interagissent allostériquement. L'occupation de ces deux sites par le nucléotide induit un important changement conformationnel qui lève l'auto-inhibition et libère l'activité kinasique du domaine catalytique. L'enzyme possède également des signaux d'adressage, et en particulier un signal de localisation nucléaire (Gudi *et al.*, 1997), ce qui la met en mesure de moduler l'expression génique par son action dans le noyau. La PKG-II peut également se trouver associée aux membranes cellulaires.

La PKG-I β est principalement localisée dans les muscles lisses, mais aussi dans le cerveau au niveau du cortex cérébral, de l'hippocampe, de l'hypothalamus et du bulbe olfactif (Geiselhöringer *et al.*, 2004 ; Feil *et al.*, 2005). Des études antérieures semblaient indiquer que la PKG-II était la PKG la plus abondante dans le cerveau, avec une expression importante dans le thalamus, le cortex,

l'amygdale et le bulbe olfactif, et plus faible au niveau du striatum, du cervelet, de l'hippocampe et de l'habenula (el-Husseini *et al.*, 1995). Toutefois, des travaux récents démontrent que la PKG- α , très exprimée dans les cellules de Purkinje du cervelet, est aussi très largement présente dans le reste du cerveau (Feil *et al.*, 2005). La protéine ou son messager sont ainsi détectables au niveau du striatum, de l'hippocampe, de l'hypothalamus dorsomédian, du noyau suprachiasmatique, mais également dans beaucoup de régions du cortex cérébral, dans l'amygdale, l'habenula, les bulbes olfactifs et au niveau de la rétine.

C-1-2 Substrats des PKG, fonctions

Les protéines identifiées comme substrats de la PKG en conditions physiologiques sont en nombre limité, et définissent les fonctions de l'enzyme.

Ainsi, la PKG phosphoryle des protéines impliquées dans la régulation de la concentration intracellulaire de calcium libre, et diminue ses effets. Ce phénomène passe, par exemple, par l'inactivation de canaux calciques membranaires, ou par celle du récepteur de l'inositol triphosphate IP₃, ce qui réduit la mobilisation du calcium issu du réticulum endoplasmique (Komalavilas & Lincoln, 1994 ; Meriney *et al.*, 1994). D'autre part, l'activation directe de l'échangeur sodium/calcium par phosphorylation diminue la concentration de calcium intracellulaire, tout comme celle, indirecte, d'une ATPase, via la phosphorylation du phospholambane (Furukawa *et al.*, 1991 ; Decrouy *et al.*, 1995).

La PKG peut également phosphoryler des protéines associées au cytosquelette, en particulier la phosphoprotéine VASP (« vasodilatator-stimulated phosphoprotein »), associée aux filaments d'actine, et la vimentine, qui appartient aux filaments intermédiaires (Walter *et al.*, 1993 ; Pryzwansky *et al.*, 1995). Des études indiquent que c'est cette action sur l'architecture cellulaire et la distribution des protéines qui serait à la base de la modulation, par la PKG, de la libération de neurotransmetteurs (Wang & Robinson, 1997).

Le substrat G et la phosphoprotéine DARPP-32 (« dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein with a molecular weight of 32 kDa ») sont deux inhibiteurs de la protéine phosphatase de type 1 (PP1) ; ils sont tous deux phosphorylés, et donc activés, par la PKG. La protéine DARPP-32 est exprimée dans les neurones épineux de taille moyenne (MSN) du striatum et régule la libération de GABA, représentant un contrôle de la neurotransmission dopaminergique (Fienberg *et al.*, 1998). *In vivo*, elle est activée soit suite à la stimulation des récepteurs

dopaminergiques sous l'action de la PKA, soit du fait de l'augmentation de cGMP en réponse à la stimulation des GC.

La PKG possède un signal de localisation nucléaire qui lui permet d'agir, dans le noyau, sur l'expression des gènes. Ainsi, l'activation de la voie du cGMP induit la transcription des gènes *c-fos*, *junB* et *egr-1*, et augmente la liaison du facteur AP1, dans un modèle cellulaire (Haby *et al.*, 1994 ; Esteve *et al.*, 2001). Parmi les facteurs de transcription phosphorylés par la PKG, on compte la protéine CREB, le facteur d'activation de la transcription ATF-1, ou encore le facteur multifonctionnel TFII-I (Gudi *et al.*, 2000 ; Casteel *et al.*, 2002). La PKG régule également l'activité d'autres facteurs de transcription en modulant la voie des MAP kinases (Pilz & Casteel, 2003).

C-2 Les phosphodiesterases des nucléotides cycliques

C-2-1 Caractérisation

Les PDE catalysent l'hydrolyse du cGMP et du cAMP par le clivage de la liaison phosphodiester, les transformant en leur 5'-monophosphate correspondant, GMP ou AMP. Elles contrôlent ainsi leurs taux intracellulaires et mettent fin à leur action (Lucas *et al.*, 2000).

Les PDE constituent un groupe multigénique dont la nomenclature dépend du gène dont elles découlent, de leurs propriétés biochimiques, de leurs régulations ou encore de leur sensibilité à divers agents pharmacologiques (Beavo *et al.*, 1995). On distingue aujourd'hui 11 familles de PDE, nommées de PDE1 à PDE11, mais qui correspondent à plus d'une vingtaine de gènes, et à plus d'une cinquantaine de protéines fonctionnelles (Lugnier, 2006). Toutes ces protéines ont en commun un domaine catalytique hautement conservé, et présentent des domaines régulateurs variés qui leur confèrent leurs particularités, qu'ils s'agissent de séquences auto-inhibitrices, de domaines d'association à la membrane ou encore de motifs de dimérisation (Francis *et al.*, 2001).

La spécificité des PDE au regard du cGMP ou du cAMP varie largement selon la famille considérée ; les différences dans l'affinité pour l'un ou l'autre nucléotide dépend d'un nombre réduit de résidus (Zhang *et al.*, 2004). En conditions physiologiques, les PDE5, 6 et 9 hydrolysent préférentiellement le cGMP, tandis que les PDE4, 7 et 8 sont sélectives pour le cAMP. Les PDE1, 2, 10 et 11, quant à elles, agissent sur les deux nucléotides. D'autre part, certaines PDE peuvent être stimulées ou inhibées par la liaison du cGMP sur des motifs régulateurs de la famille GAF (Heikaus *et al.*, 2009). En cela, les PDE2, 5, 6 (et potentiellement 10 et 11) portent une partie de l'action

intracellulaire du cGMP. Cet ensemble de caractéristiques permet une régulation fine et complexe des taux de nucléotides cycliques par les PDE.

C-2-2 Fonctions

Les PDE jouent un rôle essentiel dans les régulations des signaux cAMP et cGMP, d'autant que leur activité catabolique potentielle excède dans la plupart des cellules la capacité de synthèse des cyclases correspondantes, ce qui permet une modulation rapide et précise de ces voies de signalisation (Francis *et al.*, 2001). D'autre part, les propriétés des différentes familles de PDE leur confèrent des spécificités au niveau des tissus dans lesquels elles sont exprimées, mais également au niveau des compartiments cellulaires dans lesquelles elles exercent préférentiellement leur action. Elles participent donc pleinement à la compartimentation des signaux cAMP et cGMP (voir D-2). Elles sont aussi au coeur des interactions entre les voies du cAMP et du cGMP, certaines étant directement activées ou modulées par les nucléotides cycliques, d'autres régulées par phosphorylation (voir D-1).

Les PDE sont impliquées dans de nombreuses fonctions physiologiques et la perturbation de leur fonctionnement peut mener à l'apparition de pathologies variées. Ainsi, leur rôle dans la prolifération et la survie cellulaires est illustré par leur implication dans la génèse de certains cancers. En effet, des modèles *in vivo* et *in vitro* ont mis en évidence des perturbations de la signalisation par les nucléotides cycliques dans les cellules tumorales, perturbations induites par la surexpression pathologique de certaines isoformes des PDE (Savai *et al.*, 2010). En confirmation, des inhibiteurs de PDE s'avèrent efficaces pour stopper la prolifération de certaines cellules cancéreuses (Abusnina, 2010, 2011).

Les inhibiteurs de PDE représentent des thérapies confirmées ou des pistes thérapeutiques nouvelles dans des pathologies allant des troubles de l'érection aux psychoses en passant par les maladies métaboliques (Goldenberg, 1998 ; Lugnier, 2006 ; Boerrigter *et al.*, 2009 ; Savai *et al.*, 2010). Depuis peu, ils sont proposés comme agents capables d'améliorer les performances cognitives (Reneerkens *et al.*, 2009).

C-3 Les canaux ioniques régulés par le cGMP

Une des autres cibles du cGMP est constituée par des canaux ioniques, appelés « cyclic nucleotide-gated channels » ou CNG. Les premiers CNG découverts le furent dans les photorécepteurs de la rétine (Cook *et al.*, 1987) où ils jouent un rôle clé dans la transduction

photonique. Il s'agit de protéines membranaires dont l'activation, suite à la liaison du nucléotide cyclique, ouvre un canal perméable aux cations (Kaupp & Seifert, 2002). On les retrouve aussi dans l'épithélium olfactif, où ils ont une fonction centrale dans la transduction sensorielle.

D - Régulations de la voie du GMP cyclique et implication dans le mode d'action des drogues

D-1 Régulations croisées des voies du cAMP et du cGMP

Comme vu en C-2-1, la fixation du cGMP module l'activité de certaines PDE sélectives pour le cAMP, et agit donc sur le taux intracellulaire de ce dernier. À l'inverse, la PDE10, sélective du cGMP, peut être inhibée par le cAMP (Lugnier, 2006). Ces deux exemples indiquent que les voies des deux nucléotides cycliques sont l'objet de régulations croisées. Elles se déclinent d'autres façons. Ainsi, bien que la PKG et la PKA soient très sélectives pour leurs principaux activateurs, le cGMP peut également activer la PKA, et le cAMP activer la PKG (Forte *et al.*, 1992 ; Jiang *et al.*, 1992). L'affinité de la PKG pour le cAMP peut d'ailleurs être potentialisée par auto-phosphorylation ; de plus, les taux de cAMP étant en moyenne cinq fois plus élevés que ceux du cGMP, son action sur la PKG n'est pas négligeable (Francis *et al.*, 1988 ; Landgraf *et al.*, 1986). D'autres mécanismes s'ajoutent à ces régulations : entre autres, le récepteur NPR-C des peptides natriurétiques présente une action inhibitrice de l'AC (Rose & Giles, 2008). Ainsi, des effets observés suite à l'activation d'une des deux voies peuvent impliquer des protéines de l'autre.

D-2 Compartimentation du signal cGMP

Une caractéristique fonctionnelle très importante des signaux portés par les nucléotides cycliques est leur compartimentation cellulaire. En effet, les signaux cGMP et cAMP peuvent avoir des effets différents selon le compartiment dans lequel il sont synthétisés. Leur répartition n'est pas homogène mais comprend des micro-domaines enrichis (Castro *et al.*, 2006 ; Lugnier, 2006). Ce phénomène permet d'expliquer comment des messagers ubiquitaires comme les nucléotides cycliques sont capables de déclencher des réponses variées selon le type cellulaire (Hayes *et al.*, 1980, Kelley *et al.*, 1997).

La compartimentation peut être observée aussi bien pour le cAMP (Mika *et al.*, 2012) que pour le cGMP (Piggott *et al.*, 2006). Un exemple est présenté en figure 21. En effet, dans les myocytes de rat, l'activation d'une GC membranaire, mais pas celle de la sGC, induit l'inhibition de

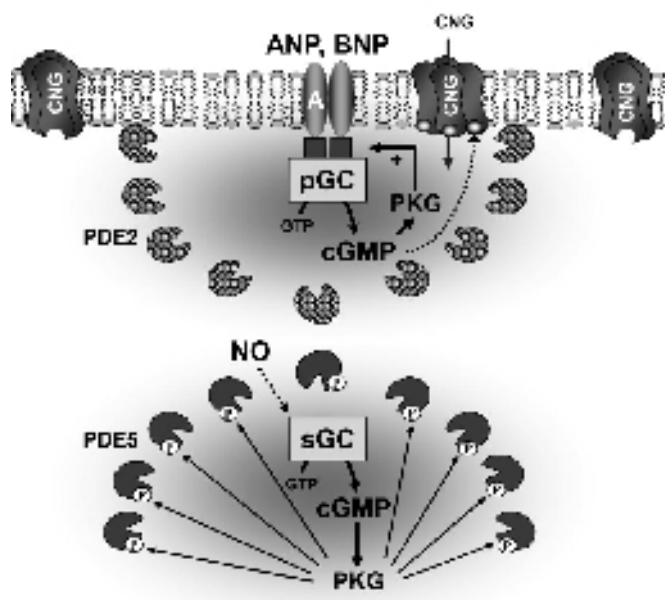
canaux calciques. Ce processus est lié à l'activité conjointe des PDE 2 et 5 et de la PKG (Castro *et al.*, 2010).

Figure 21 :
Exemple de compartimentation du cGMP

Le schéma représente la membrane du sarcolemme, sur laquelle sont insérés le récepteur GC-A à activité guanylate cyclase, et des canaux activés par le cGMP (CNG).

L'activation de la GC-A par les peptides ANP ou BNP induit la synthèse de cGMP, qui ouvre les CNG et active la PKG. Cette kinase exerce un rétrocontrôle positif sur la GC-A. La phosphodiesterase PDE2 constitue une barrière limitant la diffusion du cGMP et empêchant l'activation de tous les CNG.

L'activation de la sGC par le NO mène à la synthèse de cGMP dans un autre compartiment cytosolique. L'hydrolyse du cGMP dans ce compartiment est principalement effectuée par la PDE5, dont l'activité est potentialisée par la PKG.



Castro *et al.*, 2010

Plusieurs mécanismes participent à la compartimentation. D'une part, les PDE localisent les nucléotides cycliques dans des microdomaines et en limitent la diffusion. D'autre part, les protéines effectrices des nucléotides cycliques, PKG et PKA, sont associées à des ultrastructures cellulaires (Dell'Acqua & Scott, 1997). Enfin, certaines PDEs possèdent des sites de fixation du cGMP non catalytiques. On suppose que ces sites participent à la régulation du signal cGMP en séquestrant le nucléotide. Ce phénomène facilite également l'hydrolyse du cGMP, car il l'amène à proximité du site catalytique de l'enzyme (Corbin *et al.*, 2003).

D-3 Voie du cGMP et mode d'action des drogues

Différentes études montrent l'implication de la voie du cGMP dans le mode d'action des drogues. Les taux de cGMP sont par exemple modulés dans plusieurs structures cérébrales après des traitements chroniques par les opiacés (Liang & Clark, 2004) ou par l'éthanol (Hunt *et al.*, 1977 ; Uzbay *et al.*, 2004) ; selon la structure et le type de traitement, ces taux sont augmentés ou diminués. L'injection aiguë de cocaïne induit une libération de NO au niveau du striatum (Lee *et al.*, 2011) et du CPFm (Sammur & West, 2008). Comme signalé précédemment, le cGMP, par le biais de la PKG, module la libération des neurotransmetteurs ; l'activation de cette voie de signalisation réduit le pic de DA induit par la cocaïne (Jouvert *et al.*, 2004). Des souris dont le gène codant la

nNOS a été invalidé présentent une expression réduite de la TH dans les structures dopaminergiques et elles ne montrent pas l'augmentation progressive de l'expression de l'enzyme normalement induite suite à un traitement chronique par la cocaïne (Balda *et al.*, 2009). D'autre part, le NO serait impliqué dans la modulation de l'excitabilité des neurones pyramidaux du CPFm suite à des injections chroniques du psychostimulant (Nasif *et al.*, 2011).

Les études comportementales qui impliquent le cGMP ont à ce jour principalement utilisé des modulateurs de la voie du NO. Ainsi, des inhibiteurs des NOS ou l'invalidation du gène codant ces enzymes réduisent la sensibilisation locomotrice induite par les psychostimulants (Balda *et al.*, 2008 ; Itzhak *et al.*, 1998a) et la préférence de place à différentes drogues, dont la cocaïne (Manzanedo *et al.*, 2009 ; Itzhak *et al.*, 1998b). À l'inverse, dans des tests de discrimination, les effets de la cocaïne sont augmentés par l'inhibition de ces enzymes (Filip & Przegalinski, 1998 ; Collins *et al.*, 2001). Des études d'auto-administration de cocaïne indiquent que l'inhibition de la synthèse du NO réduit les propriétés renforçantes de la drogue (Pulvirenti *et al.*, 1996 ; Orsini *et al.*, 2002 ; Pudiak & Bozarth, 2002), alors que d'autres auteurs suggèrent une potentialisation de ses effets (Collins & Kantak, 2002).

Les travaux de notre équipe indiquent que l'activation de la voie du cGMP contrecarre différents effets de la cocaïne. Ainsi, des injections intracérébroventriculaires de CNP réduisent l'induction de gènes précoces et la libération de DA qu'elle provoque dans les structures du système mésocorticolimbique (Thiriet *et al.*, 2001). On retrouve cet effet en stimulant directement la PKG (Jouvert *et al.*, 2004). Plus récemment, nous avons montré que l'injection de CNP dans le CPFm réduisait la consommation d'alcool par les rats (Romieu *et al.*, 2008).

A mon arrivée au sein de l'équipe « Psychostimulants et processus neuroadaptatifs », en 2008, la technique d'auto-administration intraveineuse de cocaïne chez le rat y était développée depuis quelques années, et avait permis de montrer l'influence comportementale d'inhibiteurs des HDAC. Nous souhaitions approfondir les données indiquant que la voie du cGMP contrecarrait divers effets aigus de la cocaïne, et, en cela, constituait une approche intéressante pour moduler les actions de la drogue. Il nous a donc semblé pertinent de tester l'éventuelle influence de modulations de la voie du cGMP sur l'auto-administration intraveineuse de cocaïne par le rat. Ces études comportementales ont constitué l'essentiel de mon travail de thèse, nous permettant d'évaluer différents composés, injectés dans plusieurs structures cérébrales, sous différents protocoles de renforcement.

Ces données ont été complétées par des études immunohistochimiques dans le but de trouver des pistes expliquant les mécanismes sous-tendant les modulations comportementales observées. Notre équipe a été parmi les premières à démontrer l'implication de mécanismes épigénétiques dans le mode d'action de la cocaïne. Au cours de ma thèse, nous nous sommes donc naturellement tournés vers ces marqueurs, d'autant que les modulations observées suite à nos traitements ont laissé supposer des processus à moyen ou long terme.

Résultats

Publication 1 :

Cocaine self-administration by rats is inhibited by cyclic GMP-elevating agents. Involvement of epigenetic markers.

Résultats complémentaires

Publication 2 :

Overexpression of cyclic GMP-dependent protein kinase reduces MeCP2 and HDAC2 expression.

Publication 1

Cocaine self-administration by rats is inhibited by cyclic GMP-elevating agents. Involvement of epigenetic markers

Elodie Deschatrettes, Pascal Romieu, Jean Zwiller

Soumis pour publication

Résumé :

Le peptide natriurétique de type C, CNP, exerce son action par le biais de la stimulation de la voie de signalisation du GMP cyclique (cGMP), qui inclut l'activation de kinases dépendantes du cGMP. Cette voie peut également être activée par des inhibiteurs de phosphodiésterases (PDE), enzymes qui hydrolysent le cGMP. L'étude présentée ici montre que l'activation de la voie du cGMP par le CNP, par le 8-bromo-cGMP, un analogue du nucléotide qui traverse les membranes, ou par l'inhibiteur de PDE zaprinast réduit de manière dose-dépendante l'auto-administration intraveineuse de cocaïne par les rats. L'effet a été mis en évidence lorsque les composés étaient injectés in situ dans le cortex préfrontal, mais pas quand ils étaient injectés dans le noyau accumbens. Une diminution du nombre d'injections effectuées par les rats a pu être observée dans le protocole de ratio fixe 1, mais aussi dans un protocole de ratio progressif, qui évalue la motivation de l'animal pour la drogue. La réduction de l'auto-administration de cocaïne a été accompagnée d'une diminution de l'expression des marqueurs épigénétiques MeCP2 (methyl-CpG-binding protein 2) et HDAC2 (histone désacétylase 2) dans les aires de projection dopaminergiques. Une augmentation du niveau d'acétylation de l'histone H3, mais pas de l'histone H4, a également été mesurée. MeCP2 et HDAC2 étant connus pour moduler des fonctions dynamiques du cerveau adulte comme la plasticité synaptique, nos résultats, qui indiquent que l'activation de la voie de signalisation du cGMP réduit à la fois la consommation de cocaïne et l'expression de marqueurs épigénétiques, suggèrent fortement que le complexe MeCP2/HDAC2 est impliqué dans l'analyse des propriétés renforçantes de la cocaïne au niveau du cortex préfrontal.

NOTE : La version définitive de cet article est disponible sous la référence suivante :

Deschatrettes E, Romieu P, Zwiller J (2013) Cocaine self-administration by rats is inhibited by cyclic GMP-elevating agents. Involvement of epigenetic markers. *Int J Neuropsychopharmacol* 4:1-11

Cocaine self-administration by rats is inhibited by cyclic GMP-elevating agents. Involvement of epigenetic markers.

Elodie Deschatrettes¹, Pascal Romieu¹ and Jean Zwiller¹

¹ Laboratoire d'Imagerie et de Neurosciences Cognitives, UMR 7237 CNRS, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

Address for correspondence: Dr J. Zwiller, LINC, UMR 7237 CNRS, Université de Strasbourg, 12 rue Goethe, 67000 Strasbourg, France.

Tel. : +33 368 85 1978

Fax: +33 368 85 1958

E-mail: zwiller@neuro-cnrs.unistra.fr

Short Title: Cyclic GMP regulates cocaine self-administration

Statistical Summary:

Number of words in

 Abstract: 236

 Body of manuscript: 4560

Number of references: 46

Number of figures: 6

Number of tables: 0

Abstract

The C-type natriuretic peptide, CNP, exerts its action via stimulation of the cyclic GMP (cGMP) signaling pathway, which includes the activation of cGMP-dependent protein kinases. The pathway can also be activated by inhibitors of phosphodiesterases (PDE) that hydrolyze cGMP. The present report shows that activation of the cGMP pathway by CNP, by bromo-cGMP, a cell-permeant cGMP analog, or by the PDE inhibitor zaprinast dose-dependently reduces intravenous cocaine self-administration by rats. The effect was found when the compounds were injected *in situ* into the prefrontal cortex, but not when they were injected into the nucleus accumbens. A decrease in the number of cocaine infusions performed by rats was obtained under the fixed ratio-1 schedule of reinforcement as well as under a progressive ratio schedule, which evaluates the motivation of the animals for the drug. Decrease in cocaine self-administration was accompanied with reduced expression of the epigenetic markers MeCP2 (methyl-CpG-binding protein 2) and HDAC2 (histone deacetylase 2) in dopaminergic projection areas. An increase in the acetylation level of histone H3, but not of histone H4, was also noticed. Since MeCP2 and HDAC2 are known to modulate dynamic functions in the adult brain such as synaptic plasticity, our results showing that activation of the cGMP signal transduction pathway decreased both cocaine intake and expression of the epigenetic markers strongly suggest that the MeCP2/HDAC2 complex is involved in the analysis of the reinforcing properties of cocaine in the prefrontal cortex.

Keywords: cocaine self-administration, cyclic GMP, histone deacetylase, methyl-CpG binding protein MeCP2, prefrontal cortex.

Introduction

Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (cGMP) belongs to a signaling pathway implicated in various aspects of brain physiology, including development (Schmidt *et al.*, 2009), neurotransmitter release (Guevara-Guzman *et al.*, 1994; Lin *et al.*, 1995) and synaptic plasticity (Zhuo *et al.*, 1994). This intracellular second messenger is synthesized in response to the activation either of soluble guanylyl cyclase by nitric oxide or of membrane-bound guanylyl cyclases by natriuretic peptides (Chinkers and Garbers, 1991; Miki *et al.*, 1977). The C-type natriuretic peptide CNP, which acts through its receptor guanylyl cyclase-B, is the most abundant natriuretic peptide hormone expressed in the brain (Garbers, 1992; Potter *et al.*, 2006). The cellular levels of cGMP are also regulated by cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs), especially PDE5, which control its rate of degradation (Bender and Beavo, 2006). Cyclic GMP effects are predominantly mediated by the activation of cGMP-dependent protein kinases (PKGs). Since most of the components of the cGMP pathway are largely expressed in the brain, the implication of this signal transduction pathway is increasingly studied in relation to behavior and cognition. Phosphodiesterases, for instance, have recently been suggested as potential new targets for cognition enhancement (Reneerkens *et al.*, 2009).

Drug dependence is commonly viewed as a chronic brain disease characterized by compulsive drug-seeking and drug-taking behavior gaining importance over time and maintained despite severe adverse consequences. The transition from controlled drug consumption to compulsive drug use is thought to lie upon persistent molecular and cellular neuroadaptations, with an important body of work pointing towards epigenetic mechanisms. These mechanisms, which regulate the accessibility of genes to the transcriptional machinery in the mature brain, have been shown to control changes in gene expression produced by cocaine (Cassel *et al.*, 2006; Colvis *et al.*, 2005). Adaptations mainly take place in the mesocorticolimbic dopaminergic system (Nestler, 2001), which comprises neurons from the ventral tegmental area (VTA) projecting towards areas such as the nucleus accumbens (NAc) and the prefrontal cortex (PFC). This system is considered the neurological substrate by which drugs of abuse produce reinforcement (Di Chiara and Imperato, 1988).

In previous studies, we have shown that activation of the cGMP pathway attenuated several effects of cocaine. Intracerebroventricular application of CNP reduced the increase in synaptic dopamine and immediate early gene expression produced by cocaine (Thiriet *et al.*, 2001). CNP also decreased alcohol intake when injected directly into dopaminergic brain areas (Romieu *et al.*, 2008a). Moreover, a similar inhibitory effect on cocaine-induced *egr-1* expression and locomotor activity was obtained by simply activating or overexpressing PKG-I in dopaminergic structures

(Jouvert *et al.*, 2004). In the present study we explored whether injection of cGMP-elevating agents in dopaminergic structures would influence cocaine intake by rats under two self-administration protocols. The possible implication of epigenetic mechanisms in the mode of action of cGMP was investigated.

Material and methods

Animals

Male Wistar rats (Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France), weighing 180–200 g, were housed for at least 14 days in standard home cages under an inverted 12 h light–dark cycle (lights on at 7:00 PM) with *ad libitum* access to food and water. After surgery for catheter implantation into the jugular vein, animals were housed individually so that acoustic, olfactory and visual social contacts remained possible. They were allowed to recover for 5–7 days before the beginning of the drug self-administration test, which was conducted during the dark period. All procedures involving animal care were conducted in compliance with national laws and policies (Council directive 87848, 1987, Service Vétérinaire de la Santé et de la Protection Animale; permission 67-165 to JZ) and with international guidelines (NIH publication 5586-23, 1985).

Pharmacological treatment

Cocaine hydrochloride (Cooper, Melun, France) solution was adjusted with NaCl 0.9% to infuse an intravenous (i.v.) dose of 0.33 mg/kg/injection for self-administration. C-type natriuretic peptide (rat CNP-22, Sigma-Aldrich) at 0.05 and 0.5 mM and 8-bromo-cyclic GMP (Br-cG, Sigma-Aldrich) at 0.5, 5 and 50 mM were prepared in 0.9% NaCl solution. Zaprinast was diluted at 2.5 mM in a 50% dimethylsulfoxide (DMSO) solution. *In situ* injections (2 μ l in the median prefrontal cortex (mPFC) and 1 μ l in the NAc) of CNP, Br-cG, zaprinast or vehicle were administered 15 min before the beginning of each self-administration session, at a rate of 1 μ l/min.

Surgical procedures

Intravenous catheterization procedure was performed as described (Caine *et al.*, 1993). Rats were anesthetized with ketamine and xylazine prior to surgical implantation of a chronic indwelling catheter in the right jugular vein. The silicone catheter (Silastic®, Plastics One, Roanoke, VA, USA),

was fitted to a 22 gauge guide cannula 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 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 saline solution containing 100 U/ml heparin and 50 mg/ml ampicillin to prevent clotting and infection.

For daily *in situ* treatments, bilateral guide canulae were stereotaxically implanted into either the mPFC: 3 mm anterior to bregma; 0.8 mm lateral to bregma; 1.8 mm ventral from the skull, or the NAc: 1.2 mm anterior to bregma; 0.8 mm lateral to bregma; 6 mm ventral from the skull. The guide cannulae were permanently fixed to the skull with stainless steel screws and methacrylate cement. The injection sites were 1 mm more ventral. The correct placement of guide cannulae was verified by histological examination of tissue sections at the end of the experiments. Data from rats in which placements were not localized in the intended site were not included in analyses.

Cocaine operant self-administration

Drug self-administration was performed as previously described (Romieu *et al.*, 2008b) in dark operant chambers (30 x 30 x 30 cm) located in a sound-attenuated room. Briefly, a computer-driven syringe pump (Imetronic, Pessac, France) activated a 10 ml syringe and pushed fluid into silastic tubing 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; one was selected as the active hole for delivering cocaine solution and the other as the inactive hole. Disruption of an infrared photobeam in each hole (nose-poke, NP) was detected using a digital input card (DIO-24; National Instrument, Austin, TX, USA) and homemade LabView software (National Instrument). NPs into both holes were recorded. NPs into the inactive hole had no programmed consequence.

The fixed-ratio 1 (FR1) as well as a progressive ratio (PR) schedule of reinforcement were used in the present study. During the FR1 daily 2 h sessions, each NP into the active hole triggered the i.v. delivery of a 54 μ l cocaine solution over 2 s under the control of a computer. A cue light, located 20 cm above the active hole, was paired contingently with the delivery of cocaine. Ambient lighting was turned on at the end of each injection and persisted during a 40 s time-out period. No cut-off was applied concerning the number of self-infusions the rat performed during the session. In the PR schedule, the number of NPs required for each subsequent injection increased within the session, following the exponential equation $NP(n) = [5 \cdot e^{0.2n}] - 5$, “n” referring to the injection rank

(Richardson and Roberts, 1996). Delivery of cocaine and lights were the same as in FR1. PR sessions were allowed to run for 5 h, except if a rat did not trigger any injection during a 1-h period.

Immunohistochemistry

Two hours after the last self-administration session, rats were given an overdose of pentobarbital (100 mg/kg i.p.) and perfused transcardially with 50 ml saline followed by 2% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS; 0.1 M; pH 7.2; 250 ml). The brains were removed, kept overnight at 4°C in 15% sucrose, frozen in isopentane at -40°C, and stored at -80°C. Coronal tissue sections (20- μ m thick) were obtained using a Microm HM560 cryostat.

Immunohistochemistry was carried out as described previously (Cassel *et al.*, 2006). Briefly, brain sections were incubated with the following primary polyclonal antibodies: anti-MeCP2 (1:150 dilution; Millipore, Billerica, MA), anti-HDAC2 (1:200 dilution, Millipore), anti-acetyl-H3 (1:200 dilution, Millipore) or anti-acetyl-H4 (1:1000 dilution, Millipore). Sections were then successively incubated with biotinylated horse anti-rabbit IgG (1:200 dilution) and with an avidin-biotin-peroxidase complex (Vectastain ABC kit, Vector Lab., Burlingame, CA). Staining was revealed with the chromagen 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride and H₂O₂. Sections were then incubated in a 2.5 μ M bisbenzimidazole (Hoechst 33258; Sigma-Aldrich) solution to label nuclei and the slides were coverslipped with Mowiol. Staining was observed under a fluorescent Leitz DM RB binocular microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Two photomicrographs of the same field were taken with an Axiocam camera (Carl Zeiss, Jena, Germany); one was used to count the total number of nuclei stained with Hoechst 33258 and the other to count the number of immunoreactive cells for a given antigen. Positively stained nuclei were counted in the mPFC, dorsal caudate putamen (CPu) and in NAc shell (NAcS), using ImageJ 1.43 software (NIH, MA). The percentage of immunoreactive cells was calculated from counts on at least 600 cells by an investigator blind to the experimental conditions. For each measure, 6 to 8 counts were performed on 4 sections from 3 to 6 different rats.

Statistical analysis

Results are expressed as means \pm S.E.M. Effect of the various treatments during the totality of either FR1 or PR sessions was analyzed by two-way ANOVA for repeated measures (treatment and session as factors of variation) between groups of rats. Protein expression was analyzed by a one-way ANOVA on the data from each treatment or by Student's *t* test when comparing two groups.

Student-Newman-Keuls post-hoc tests were performed when required, and significance was set at $p \leq 0.05$. Statistical analysis was performed using SigmaStat (Systat software, Chicago, IL).

Results

Effect of PKG activation on cocaine self-administration under an FR1 schedule of reinforcement

We first tested the effect on cocaine reinforcement of a PKG activator injected directly into the mPFC. The cell permeant cGMP analog, 8-bromo-cyclic GMP (Br-cG), was injected 15 min before each daily self-administration session. An FR1 schedule of reinforcement was used with a cocaine dosage of 0.33 mg/kg/infusion. Under these conditions, it is noteworthy that rats acquired an efficient self-administration behavior from the first day of testing (Fig. 1). Throughout the studies, rats were considered for analysis only if they directed at least 70% of the NPs onto the active hole (data not shown). Figure 1a shows that saline-treated rats (vehicle) displayed a stable level of cocaine intake after 3 daily sessions, corresponding to an average number of 103 injections. Daily *in situ* administration of Br-cG 15 min before the beginning of the self-administration session resulted in a dose-dependent reduction in cocaine intake. The lower dose of 0.5 mM Br-cG did not produce any statistically significant decrease in cocaine self-injections, whereas the higher dose of 5 mM Br-cG induced a significant effect in sessions 4, 6 and 7. During that last session, a 26% reduction of self-injections was noticed.

When a similar treatment using Br-cG was carried out into the NAc (Fig. 1b), vehicle-treated rats showed again a stable level of cocaine intake after 4 sessions, with a daily number of self-injections close to that observed with intra-mPFC treatment. Under these conditions, neither the 5 mM Br-cG dose, nor the very high dose of 50 mM, had any effect on cocaine intake during the 7 daily sessions. We therefore focused on intra-mPFC treatment in the rest of the study.

Effect of cGMP-elevating agents on cocaine self-administration under the FR1 schedule of reinforcement

We then used two additional and complementary approaches to increase local levels of cGMP: injection of CNP, an activator of the particulate GC-B enzyme that thus increases cGMP synthesis, and zaprinast, an inhibitor of cGMP-selective phosphodiesterases, which consequently reduces cGMP hydrolysis. Similarly to the protocol we used for Br-cG, the products were injected into the mPFC 15 min before the beginning of each daily self-administration session. When compared to saline-treated rats (Fig. 2a), CNP-treated animals showed a dose-dependent decrease in

cocaine intake under the FR1 schedule. Reduction in self-injections was statistically significant only for rats treated with the higher dose of 0.5 mM CNP. It appeared after 5 sessions and its magnitude was about 25%, which was comparable to the effect produced by Br-cG.

Figure 2b shows the effect of intra-cortical injections of zaprinast. Rats treated with vehicle, here 50% DMSO, displayed a stable number of self-injections after 3 sessions to reach an average of around 107 injections per session. When treated with daily injections of 2.5 mM zaprinast before each self-administration session, animals also showed a reduction in cocaine intake, which was significant from session 5 onwards. A reduction of 25% was observed at session 7.

Effect of cGMP-elevating agents on cocaine self-administration under a PR schedule

We next tested whether increasing cellular cGMP levels in the mPFC would also restrain the motivation of the animals for cocaine, using a PR schedule of reinforcement, in which the number of NPs required for successive drug delivery followed an exponential ascending equation. Rats were first submitted to 3 sessions of FR1 using a cocaine dosage of 0.33 mg/kg/infusion, in order to achieve a stable number of injections. They were then switched to the PR protocol, and intra-mPFC treatment started. CNP, the activator of cGMP biosynthesis, and the direct PKG activator Br-cG were tested at the doses that produced an effect under the FR1 schedule. The compounds were injected into the mPFC 15 min before the beginning of each daily PR session. Figure 3a shows that rats from all experimental groups rapidly acquired the PR protocol. When compared to saline-treated animals, rats treated with cGMP-elevating agents reached a lower breaking point, expressed as the number of self-injections accomplished within a given session. The decrease was statistically significant after 6 sessions; it is noteworthy that at the doses used, both treatments had a similar effect, whether considering onset or amplitude. The reducing effect of Br-cG or CNP treatment on drug intake is more manifest when considering the final ratio, which corresponds to the number of NPs that the animal had to achieve in order to obtain the last injection (Fig. 3b). During the last session for instance, control animals performed an average of 900 NPs into the active hole to obtain the last injection, whereas this number dropped to 396 and 573 for rats treated with Br-cG and CNP, respectively.

Implication of MeCP2 expression in the mode of action of GMP-elevating agents

To investigate the possible implication of epigenetic mechanisms in the mode of action of cGMP, we measured the expression of epigenetic markers, using immunohistological techniques carried out

on brain sections from rats that had been submitted to seven cocaine self-administration sessions under the FR1 protocol. We first tested the involvement of the methyl-CpG-binding protein MeCP2, since we have demonstrated that it is induced by the repeated administration of cocaine (Cassel *et al.*, 2006; Host *et al.*, 2011). Figure 4 shows the quantitative analysis of cells expressing MeCP2 in the dorsal CPu, in the NAc shell and in the mPFC of rats injected with Br-cG and CNP into the mPFC and killed 2 h after the last self-administration session. The lower dose of 0.5 mM Br-cG, which had no significant effect on the cocaine-intake behavior, also did not modify the MeCP2 protein level. At the opposite, the higher dose of 5 mM Br-cG significantly reduced MeCP2 expression in each of the structures examined (by 26%, 25% and 35% in the CPu, NAc and mPFC, respectively), showing a positive correlation with the behavioral effect. Similarly, the dosage of 0.5 mM CNP injected into the mPFC, which reduced cocaine intake by rats, also reduced MeCP2 expression in the three structures examined. A 27%, 36% and 38% decrease was found in the dorsal CPu, NAc shell and mPFC, respectively.

Implication of histone acetylation in the mode of action of GMP-elevating agents

Since MeCP2 is often found in a complex together with histone deacetylase 2 (HDAC2), we next measured HDAC2 expression in adjacent sections from the same rats. The number of HDAC2 immunoreactive cells was also found to be reduced in the three structures examined (by 14%, 28% and 33% in the CPu, NAc and mPFC, respectively) in CNP-treated rats compared to saline-treated rats (Fig. 5a). Since counting the number of immunoreactive cells portrays only one aspect of HDAC2 expression, we also estimated HDAC enzymatic activity by measuring histone acetylation levels in the same structures. In agreement with HDAC2 activity being down-regulated, we found a corresponding increase of K9/K13Ac-H3, but not of K5/K8/K12/K16Ac-H4 immunoreactivity. CNP treatment was found to increase AcH3 labeling in the three structures (Fig. 5b). A 40%, 54% and 65% increase was found in the CPu, NAc and mPFC, respectively. On the other hand, CNP was not found to increase acetylation levels of histone H4 2 h after the last self-administration session (Fig. 5c).

Illustration of CNP effect on MeCP2 and HDAC2 protein expression as well as on the acetylation levels of histone H3 and H4

Figure 6 illustrates MeCP2 and HDAC2 immunostaining as well as H3 and H4 acetylation levels found in the mPFC of rats that received intra-mPFC injections of CNP before each of the 7 daily cocaine self-administration sessions carried out under the FR1 schedule of reinforcement.

Immunoreactivity was exclusively found in cell nuclei, as expected for proteins that bind DNA or histones. CNP injections before each self-administration session clearly reduced the number of cells expressing MeCP2 and HDAC2, when compared to saline-treated rats. On the opposite, Ac-H3 labeling was increased, while no difference in the number of labeled nuclei was noticed between treated and control animals concerning the acetylation level of H4. It is noteworthy that labeling intensity of MeCP2 protein was somewhat reduced by the CNP treatment, while that of Ac-H3 and Ac-H4 was enhanced.

Discussion

Among animal models used to investigate drugs and their neurological consequences, self-administration procedures provide a refined behavioral tool for the elucidation of pathways underlying drug-induced behavior (Arnold and Roberts, 1997). In this context, we report here that activation of the cGMP pathway in the mPFC reduces intravenous cocaine self-administration by rats. The data therefore extend previous reports from our laboratory demonstrating that activation of this pathway in the brain reduces other effects of the psychostimulant, as well as effects of alcohol (Jouvert et al., 2004; Romieu et al., 2008a; Thiriet et al., 2001). They also comfort other behavioral studies focused on inhibitors of NO synthase which were also shown to modulate cocaine self-administration (Pudiak and Bozarth, 2002; Pulvirenti et al., 1996). Decrease in cocaine self-administration was accompanied with reduced expression of MeCP2 and HDAC2, the latter being probably responsible for the increase in the level of histone H3 acetylation in dopaminergic structures. Our results show that the cGMP pathway modulates epigenetic markers in the mPFC, which participate in the analysis of the reinforcing properties of cocaine.

We used three compounds which were selected for their differential action on the intracellular cGMP signaling. The CNP peptide is an endogenous ligand of the particulate GC-B and represents therefore a physiological activator of cGMP synthesis (Potter et al., 2006). Zaprinast is an inhibitor of PDE enzymes that hinders cyclic nucleotide hydrolysis. It displays highest selectivity for PDE5, but it also exerts some effects through inhibition of PDE1, 9, 10 and 11 (Bender and Beavo, 2006). Thus, while mainly increasing cGMP levels, it may also target cAMP hydrolysis to some extent. On the other hand, the cell-permeant cGMP analog, Br-cG, is a direct activator of PKG that has little effect on other cGMP effectors such as PDEs. Interestingly, when injected *in situ* in the mPFC, all three compounds decreased with similar amplitude the number of self-injections triggered by rats. Moreover, a similar decrease in the number of cocaine infusions performed by rats was obtained under a PR schedule, which models the motivation of the animals for the drug.

No effect was observed when the same treatment was performed in the NAc (Fig. 1b) or in the amygdala (data not shown), instead of the prefrontal cortex. It is noteworthy in this context that cocaine self-administration was not altered by the systemic injection of papaverine, a PDE10A inhibitor (data not shown). When considering that PDE10A is highly enriched in the striatum, our results are in favor of the cGMP pathway controlling the effects of cocaine in the mPFC and not in the NAc. Interestingly, the mPFC is known to be implicated in the higher integration of reward and

environmental signals, goal-directed action, decision making, and long-term planning (Dalley *et al.*, 2004). Impairment in its function leads to impulsive and compulsive behavior, and is thought to play an important role in the onset of dependence (Goldstein and Volkow, 2002). Behavioral studies point towards its role in the regulation of drug intake. Our study therefore is in agreement with the cGMP pathway being a negative regulator of drug intake within this structure.

Most of the cGMP effects are mediated by the activation of PKG which then phosphorylates various targets. In the brain, PKG has been shown to modulate presynaptic activity and long-term potentiation (Zhuo *et al.*, 1994). PKG substrates include Ca²⁺ channels (Hell *et al.*, 1994), the inositol-trisphosphate receptor (Ruth *et al.*, 1993) and phospholamban (Decrouy *et al.*, 1995). This indicates that activation of PKG reduces neurotransmitter efflux by decreasing the intracellular concentration of free Ca²⁺. Studies from several laboratories, including our, have shown that cGMP reduces dopamine release in cellular and *in vivo* models (Guevara-Guzman *et al.*, 1994; Samson *et al.*, 1988; Thiriet *et al.*, 2001). On the other hand, PKG may also act on systems known to regulate activity of dopaminergic neurons, such as DARPP-32 (DA- and cAMP-regulated phosphoprotein) (Tsou *et al.*, 1993). Once phosphorylated by PKG, DARPP-32 inhibits the activity of protein phosphatase type-1, which subsequently modulates the efficacy of glutamatergic neurotransmission (Fienberg *et al.*, 1998). But clearly, these short-term responses to intracellular cGMP rise should only be considered as initial events triggering some cellular adaptations, which are then responsible for the behavioral influence. Undeniably, the decrease in cocaine intake by rats observed under both the FR1 and PR protocols appeared over time and reached significance only after several daily sessions, suggesting that the underlying neuronal long-term adaptations have to reach a certain threshold in order for the effect to become statistically significant.

It is now well accepted that long-term effects of cocaine involve the expression of an array of genes (Nestler, 2001). Effectively, cocaine injection to rats has been shown to induce the expression of immediate early genes in neurons, a phenomenon that can be blocked by the previous activation of the cGMP pathway (Jouvert *et al.*, 2004; Thiriet *et al.*, 2001). Recent evidence suggests that drug-induced chromatin remodeling contributes to long-lasting changes in gene expression and ultimately to addictive behavior (Cassel *et al.*, 2006; Levine *et al.*, 2005; Renthall *et al.*, 2007). The main factor influencing chromatin compaction is the state of amino-acid residues within histone tails which serve as targets for a variety of reversible post-translational modifications (Berger, 2002). The best characterized covalent modification of histones is acetylation (de Ruijter *et al.*,

2003), which is a reversible process that is governed by the opposing actions of histone acetyltransferases (Roth *et al.*, 2001) and HDACs (Lopez-Rodas *et al.*, 1993). In general, increased histone acetylation is associated with DNA relaxation and elevated transcriptional activity, whereas decreased acetylation results in tighter DNA coiling and gene silencing (Marushige, 1976). HDACs are recruited to target genes via their direct association with transcriptional activators and repressors like MeCP2 (Nan *et al.*, 1998). Inhibitors of HDACs have been extensively used in behavioral tests with contrasting results; nonetheless the studies all show the influence of chromatin remodeling on drug-related behavior (Renthal and Nestler, 2008; Romieu *et al.*, 2008b).

Previous reports have demonstrated that cocaine induces the expression of MeCP2 and HDAC2 in rat striatum and frontal cortex (Cassel *et al.*, 2006). Acetylation levels of histone H3 are also regulated by repeated cocaine treatment (Cassel *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2009). In the present study, we found that MeCP2 and HDAC2 were down-regulated in dopaminergic structures, concomitantly with a decrease in cocaine intake by rats, upon activation of the cGMP pathway. That the cGMP signal transduction system is causal for decreased MeCP2 and HDAC2 expression in this context is strongly suggested by experiments that showed that acute activation of the cGMP pathway was sufficient to reduce the expression of these epigenetic markers in the absence of cocaine treatment (manuscript in preparation). However, the fact that cGMP-elevating agents injected in the mPFC reduced also immunostaining in the CPu and the NAc rules out direct phosphorylation processes. This is corroborated by the observation that neither the amount of phospho-H3 on Ser-10, nor that of phospho-MeCP2 on Ser-80, was increased upon PKG activation (data not shown).

Modulators of the cGMP/PKG pathway, especially PDE inhibitors, have been used as therapeutic tools for some time, with a variety of applications ranging from erectile dysfunction to cancer (Boerrigter *et al.*, 2009; Goldenberg, 1998; Lugnier, 2006; Savai *et al.*, 2010). More recent data indicate that they are possible cognitive enhancers (Reneerkens *et al.*, 2009). Our data emphasize the role of the cGMP pathway in reward-related structures and suggest therapeutic potential for diverse psychiatric disorders, including drug addiction.

Acknowledgments

We thank M. O. Revel for help with immunohistological techniques, and L. Host for assistance during surgery. We gratefully acknowledge funding provided by the CNRS, the Université de Strasbourg and by the Association Française du Syndrome de Rett (AFSR).

Statement of Interest

None.

References

- Arnold JM, Roberts DC (1997) A critique of fixed and progressive ratio schedules used to examine the neural substrates of drug reinforcement. *Pharmacol Biochem Behav* 57:441-447.
- Bender AT, Beavo JA (2006) Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev* 58:488-520.
- Berger SL (2002) Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev* 12:142-148.
- Boerrigter G, Lapp H, Burnett JC (2009) Modulation of cGMP in heart failure: a new therapeutic paradigm. *Handb Exp Pharmacol*:485-506.
- 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, UK: Oxford University Press.
- Cassel S, Carouge D, Gensburger C, Anglard P, Burgun C, Dietrich JB, Aunis D, Zwiller J (2006) Fluoxetine and cocaine induce the epigenetic factors MeCP2 and MBD1 in adult rat brain. *Mol Pharmacol* 70:487-492.
- Chinkers M, Garbers DL (1991) Signal transduction by guanylyl cyclases. *Annu Rev Biochem* 60:553-575.
- Colvis CM, Pollock JD, Goodman RH, Impey S, Dunn J, Mandel G, Champagne FA, Mayford M, Korzus E, Kumar A, Renthal W, Theobald DE, Nestler EJ (2005) Epigenetic mechanisms and gene networks in the nervous system. *J Neurosci* 25:10379-10389.
- Dalley JW, Cardinal RN, Robbins TW (2004) Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. *Neurosci Biobehav Rev* 28:771-784.
- 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.
- Decrouy A, Juteau M, Rousseau E (1995) Examination of the role of phosphorylation and phospholamban in the regulation of the cardiac sarcoplasmic reticulum Cl⁻ channel. *J Membr Biol* 146:315-326.
- 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 USA* 85:5274-5278.
- Fienberg AA et al. (1998) DARPP-32: regulator of the efficacy of dopaminergic neurotransmission. *Science* 281:838-842.
- Garbers DL (1992) Guanylyl cyclase receptors and their endocrine, paracrine and autocrine ligands. *Cell* 71:1-4.
- Goldenberg MM (1998) Safety and efficacy of sildenafil citrate in the treatment of male erectile dysfunction. *Clin Ther* 20:1033-1048.
- Goldstein RZ, Volkow ND (2002) Drug addiction and its underlying neurobiological basis: neuroimaging evidence for the involvement of the frontal cortex. *Am J Psychiatry* 159:1642-1652.

- Guevara-Guzman R, Emson PC, Kendrick KM (1994) Modulation of in vivo striatal transmitter release by nitric oxide and cyclic GMP. *J Neurochem* 62:807-810.
- Hell JW, Appleyard SM, Yokoyama CT, Warner C, Catterall WA (1994) Differential phosphorylation of two size forms of the N-type calcium channel alpha 1 subunit which have different COOH termini. *J Biol Chem* 269:7390-7396.
- 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* 25:222-229.
- 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* 24:10716-10725.
- Levine AA, Guan Z, Barco A, Xu S, Kandel ER, Schwartz JH (2005) CREB-binding protein controls response to cocaine by acetylating histones at the fosB promoter in the mouse striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:19186-19191.
- Lin AM, Kao LS, Chai CY (1995) Involvement of nitric oxide in dopaminergic transmission in rat striatum: an in vivo electrochemical study. *J Neurochem* 65:2043-2049.
- Lopez-Rodas G, Brosch G, Georgieva EI, Sendra R, Franco L, Loidl P (1993) Histone deacetylase. A key enzyme for the binding of regulatory proteins to chromatin. *FEBS Lett* 317:175-180.
- Lugnier C (2006) Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacol Ther* 109:366-398.
- Marushige K (1976) Activation of chromatin by acetylation of histone side chains. *Proc Natl Acad Sci USA* 73:3937-3941.
- Miki N, Kawabe Y, Kuriyama K (1977) Activation of cerebral guanylate cyclase by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 75:851-856.
- Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A (1998) Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393:386-389.
- Nestler EJ (2001) Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat Rev Neurosci* 2:119-128.
- Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM (2006) Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr Rev* 27:47-72.
- Pudiak CM, Bozarth MA (2002) The effect of nitric oxide synthesis inhibition on intravenous cocaine self-administration. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 26:189-196.
- Pulvirenti L, Balducci C, Koob GF (1996) Inhibition of nitric oxide synthesis reduces intravenous cocaine self-administration in the rat. *Neuropharmacology* 35:1811-1814.
- Reneerkens OA, Rutten K, Steinbusch HW, Blokland A, Prickaerts J (2009) Selective phosphodiesterase inhibitors: a promising target for cognition enhancement. *Psychopharmacology (Berl)* 202:419-443.
- Renthal W, Nestler EJ (2008) Epigenetic mechanisms in drug addiction. *Trends Mol Med* 14:341-350.
- Renthal W, Maze I, Krishnan V, Covington HE, 3rd, Xiao G, Kumar A, Russo SJ, Graham A, Tsankova N, Kippin TE, Kerstetter KA, Neve RL, Haggarty SJ, McKinsey TA, Bassel-Duby

- R, Olson EN, Nestler EJ (2007) Histone deacetylase 5 epigenetically controls behavioral adaptations to chronic emotional stimuli. *Neuron* 56:517-529.
- Richardson NR, Roberts DC (1996) Progressive ratio schedules in drug self-administration studies in rats: a method to evaluate reinforcing efficacy. *J Neurosci Methods* 66:1-11.
- Romieu P, Gobaille S, Aunis D, Zwiller J (2008a) Injection of the neuropeptide CNP into dopaminergic rat brain areas decreases alcohol intake. *Ann NY Acad Sci* 1139:27-33.
- Romieu P, Host L, Gobaille S, Sandner G, Aunis D, Zwiller J (2008b) Histone deacetylase inhibitors decrease cocaine but not sucrose self-administration in rats. *J Neurosci* 28:9342-9348.
- Roth SY, Denu JM, Allis CD (2001) Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* 70:81-120.
- Ruth P, Wang GX, Boekhoff I, May B, Pfeifer A, Penner R, Korth M, Breer H, Hofmann F (1993) Transfected cGMP-dependent protein kinase suppresses calcium transients by inhibition of inositol 1,4,5-trisphosphate production. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:2623-2627.
- Samson WK, Bianchi R, Mogg R (1988) Evidence for a dopaminergic mechanism for the prolactin inhibitory effect of atrial natriuretic factor. *Neuroendocrinology* 47:268-271.
- Savai R, Pullamsetti SS, Banat GA, Weissmann N, Ghofrani HA, Grimminger F, Schermuly RT (2010) Targeting cancer with phosphodiesterase inhibitors. *Expert Opin Investig Drugs* 19:117-131.
- Schmidt H, Stonkute A, Juttner R, Koesling D, Friebe A, Rathjen FG (2009) C-type natriuretic peptide (CNP) is a bifurcation factor for sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:16847-16852.
- Thiriet N, Jouvert P, Gobaille S, Solov'eva O, Gough B, Aunis D, Ali S, Zwiller J (2001) C-type Natriuretic Peptide (CNP) regulates cocaine-induced dopamine increase and immediate early gene expression in rat brain. *Eur J Neurosci* 14:1702-1708.
- Tsou K, Snyder GL, Greengard P (1993) Nitric oxide/cGMP pathway stimulates phosphorylation of DARPP-32, a dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein, in the substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:3462-3465.
- Wang L, Lv Z, Hu Z, Sheng J, Hui B, Sun J, Ma L (2009) Chronic Cocaine-Induced H3 Acetylation and Transcriptional Activation of CaMKIIalpha in the Nucleus Accumbens Is Critical for Motivation for Drug Reinforcement. *Neuropsychopharmacology*.
- Zhuo M, Hu Y, Schultz C, Kandel ER, Hawkins RD (1994) Role of guanylyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase in long-term potentiation. *Nature* 368:635-639.

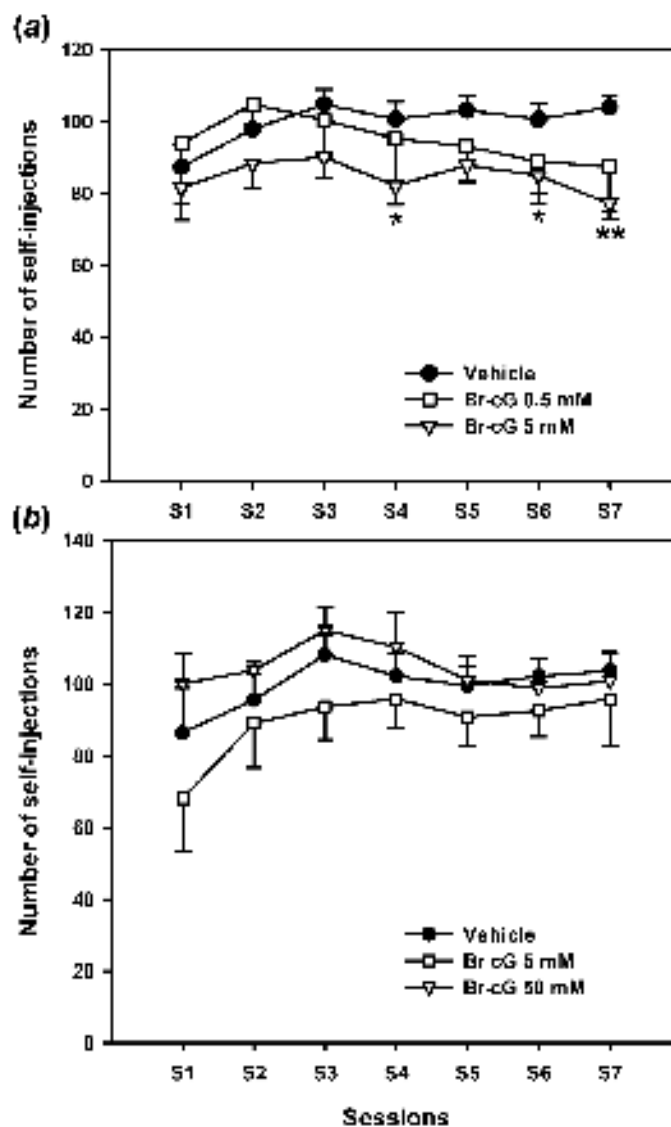


Fig. 1. Effect of Br-cG on cocaine self-administration under the FR1 schedule of reinforcement. Br-cG (0.5, 5 or 50 mM, as indicated) or vehicle (0.9% NaCl solution) was injected into either (a) the mPFC or (b) the NAc 15 min before the beginning of each cocaine self-administration session (0.33 mg/kg/infusion). Injection volume was 2 μ l in the mPFC and 1 μ l in the NAc. Numbers of self-injections performed during the 2 h daily sessions are expressed as means \pm S.E.M. ($n = 11-21$ per group for intra-mPFC injection; $n = 4-6$ per group for intra-NAc injection). * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, comparison with control rats injected with vehicle (ANOVA followed by Student-Newman-Keuls post hoc test).

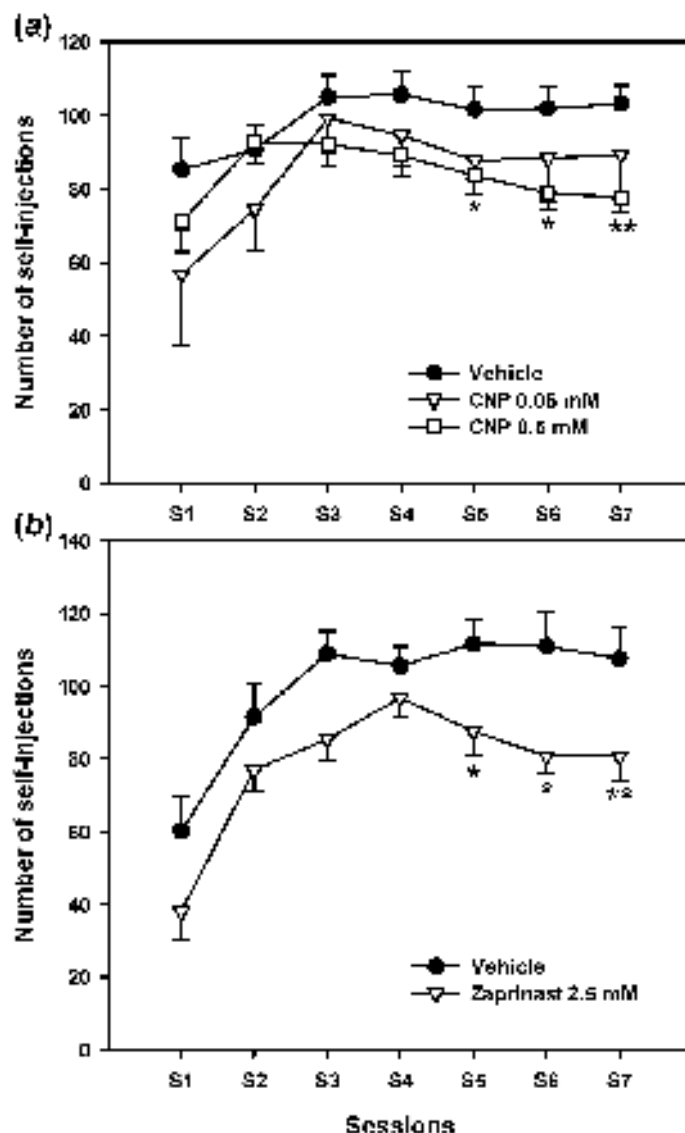


Fig. 2. Effect of (a) CNP and of (b) zaprinast on cocaine self-administration under the FR1 schedule of reinforcement. (a) CNP at 0.05 or 0.5 mM or vehicle (0.9 % NaCl solution) was injected into the mPFC 15 min before the beginning of each cocaine self-administration session. (b) 2.5 mM zaprinast or vehicle (50% DMSO) was injected into the mPFC under the same conditions. Numbers of self-injections performed during the 2 h daily sessions are expressed as means \pm S.E.M. ($n = 12-21$ per group for CNP treatment; $n = 12$ for zaprinast treatment). * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, comparison with control rats injected with vehicle (ANOVA followed by Student-Newman-Keuls post hoc test).

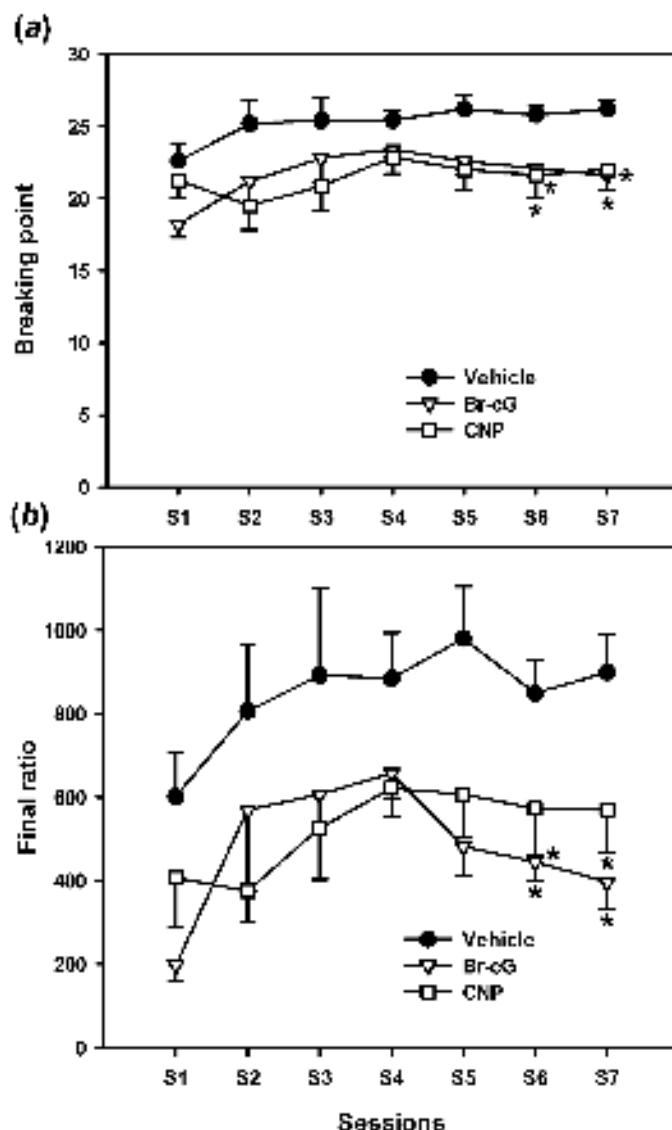


Fig. 3. Effect of Br-cG and CNP on cocaine self-administration under a PR schedule of reinforcement. Five mM Br-cG, 0.5 mM CNP or vehicle (0.9% NaCl solution) was injected into the mPFC 15 min before the beginning of each cocaine (0.33 mg/kg/infusion) self-administration session. (a) Total numbers of self-injections performed during each 5 h daily session, expressed as means \pm S.E.M. ($n = 7-10$ per group). (b) Final ratio, i.e. number of active nose pokes required for obtaining the last injection during each session, expressed as mean \pm S.E.M. * $p < 0.05$, comparison with control rats injected with vehicle (ANOVA followed by Student-Newman-Keuls post hoc test).

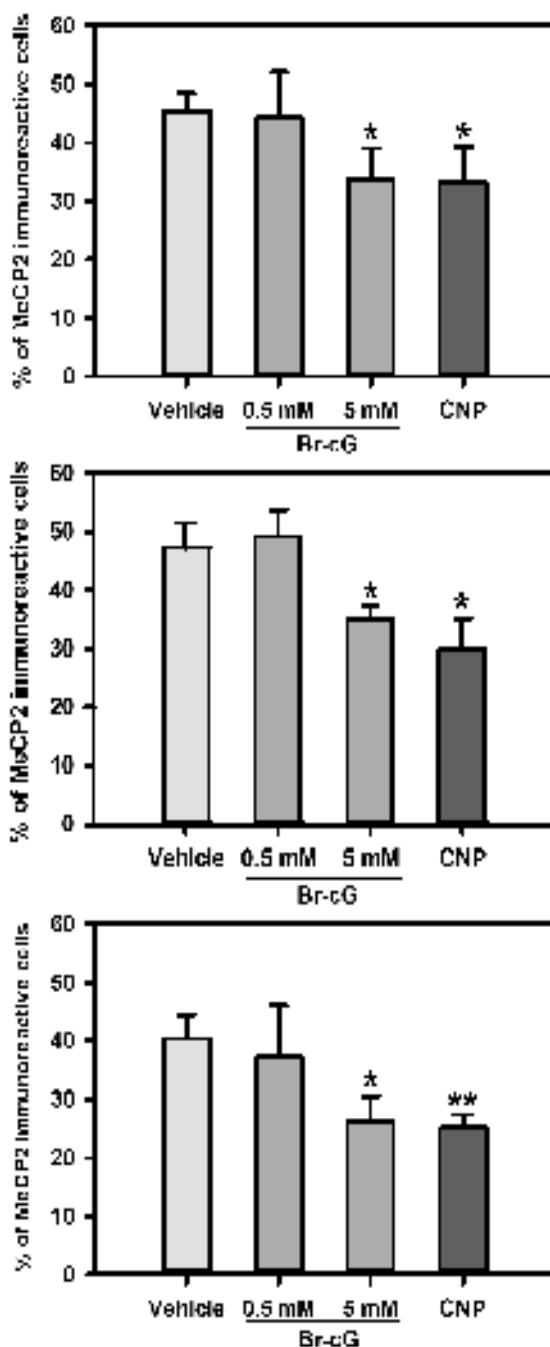


Fig. 4. Quantification of cells expressing MeCP2 in rats which have been submitted to 7 daily sessions of cocaine self-administration. Animals were injected into the mPFC with 0.5 or 5 mM Br-cG, 0.5 mM CNP or 0.9% NaCl solution 15 min before the beginning of each session. They were sacrificed 2 h after the last session. Quantification was carried out in the dorsal CPu (upper panel), in the Nac shell (middle panel) and in the mPFC (lower panel). The percentage of immunoreactive cells was calculated from 6 to 8 counts on three serial sections ($n = 4$ to 6 rats per group). * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, comparison with control rats (ANOVA followed by Student-Newman-Keuls post hoc test).

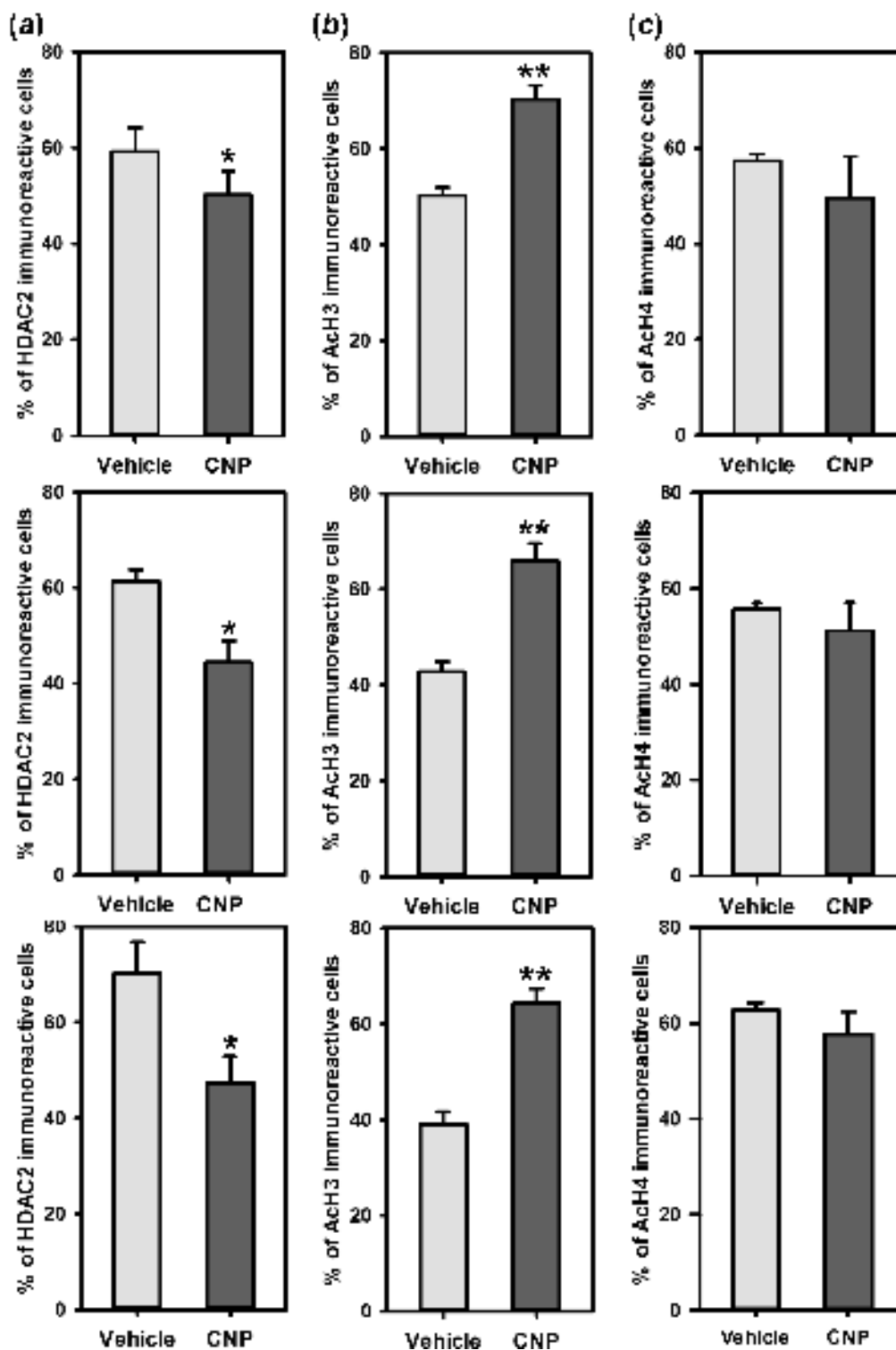


Fig. 5. Quantification of cells expressing (a) HDAC2, (b) K9/K13Ac-H3 and (c) K5/K8/K12/K16Ac-H4 in rats which have been submitted to 7 daily sessions of cocaine self-administration. Animals were injected into the mPFC with 0.5 mM CNP or vehicle 15 min before the beginning of each session. They were sacrificed 2 h after the last session. Quantification was carried out in the dorsal CPu (upper panels), in the Nac shell (middle panels) and in the mPFC (lower panels). The percentage of immunoreactive cells was calculated from 5 to 7 counts on three serial sections ($n = 4$ to 6 rats per group). * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, comparison with control rats injected with vehicle (Student's t test).

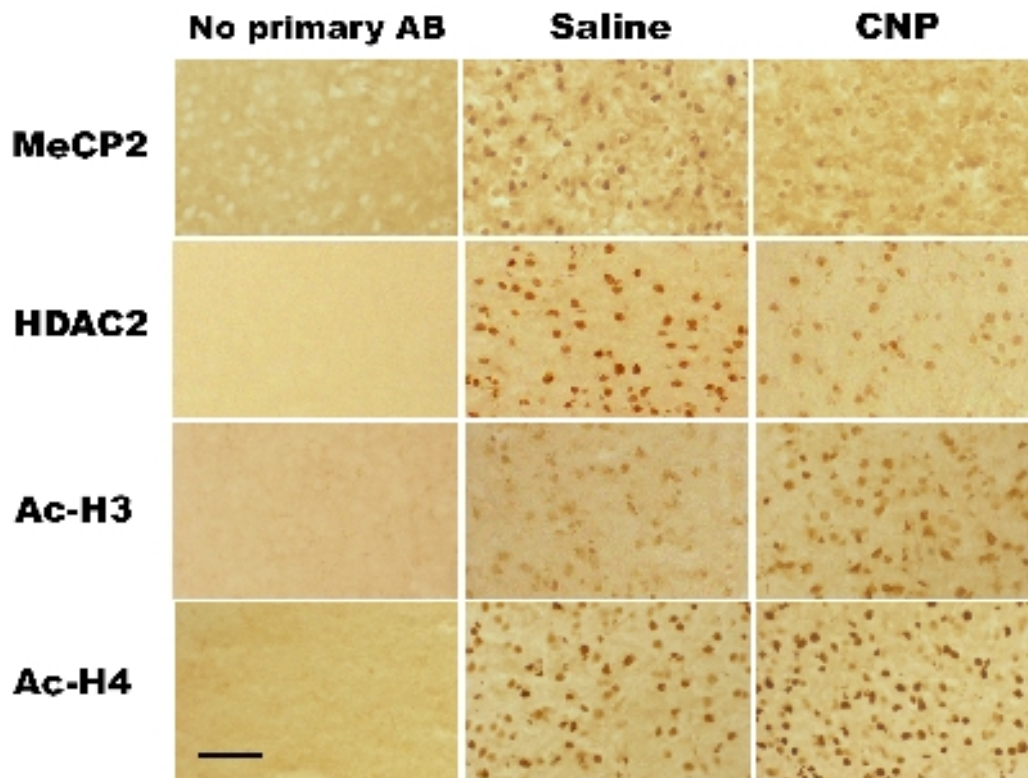


Fig. 6. Photomicrographs showing MeCP2, HDAC2, Ac-H3 and AcH4 immunoreactivity in the mPFC from rats that have been submitted to 7 daily sessions of cocaine self-administration. Animals were injected into the mPFC with 0.5 mM CNP or vehicle, and sacrificed 2 h after the last session. Coronal tissue sections (20 μ m) were incubated with rabbit polyclonal antibodies raised against MeCP2, HDAC2 K9/K13Ac-H3 or K5/K8/K12/K16Ac-H4. Antibody binding was detected with secondary biotinylated antibody and peroxidase reaction. 'No primary AB' refers to experiments in which the primary antibody was omitted. Scale bar applicable to all micrographs, 100 μ m.

Résultats complémentaires

Les résultats présentés ci-après complètent l'étude détaillée dans la publication 1. Ils correspondent à des données complémentaires concernant le déroulement de l'auto-administration, mais aussi à l'étude des effets d'autres traitements pharmacologiques sur le comportement des animaux. Les résultats d'analyses immunohistochimiques supplémentaires sont également présentés. Certaines de ces données correspondent aux « data not shown » signalés dans les publications.

A - Validation du protocole expérimental

A-1 La chirurgie stéréotaxique ne modifie pas le comportement d'auto-administration des rats

Afin de vérifier que l'implantation des guide-canules dans le CPFm et les injections in situ quotidiennes n'ont pas d'effet sur le comportement des rats, nous avons comparé des animaux ayant reçu des injections des solutions de véhicule à des rats n'ayant pas subi de chirurgie stéréotaxique. Ces derniers n'ont donc été opérés que pour l'implantation du cathéter intraveineux. La figure 22 montre le nombre d'injections déclenchées par ces différents groupes de rats sous le protocole de FR1 (cocaïne 0,33 mg/kg/injection).

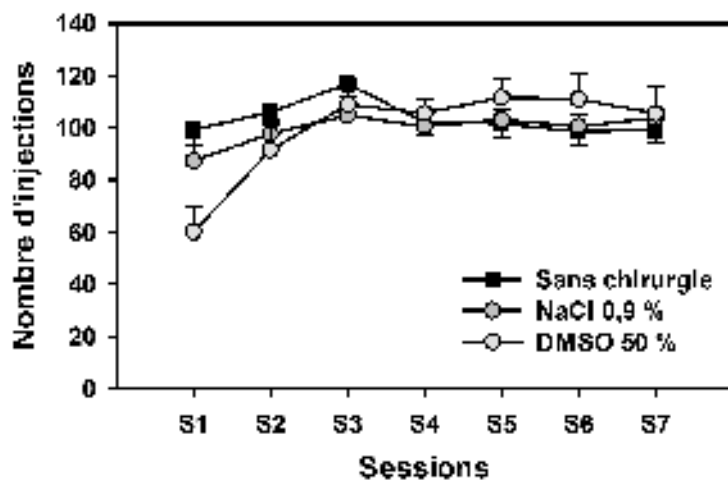


Figure 22 : Contrôle de l'influence de la chirurgie stéréotaxique sur le comportement d'auto-administration des rats.

Nombre d'injections déclenchées dans le protocole de FR1 (cocaïne 0,33 mg/kg/injection) par des rats ayant reçu des injections de solutions de NaCl 0,9 % ou de DMSO 50 % dans le CPFm ou n'ayant pas subi la chirurgie stéréotaxique. Les résultats sont présentés sous la forme de moyennes \pm SEM (n = 11 à 18).

Ni les injections quotidiennes de NaCl 0,9 % ni celles de DMSO 50 % n'ont eu d'influence sur le comportement d'auto-administration ; dans ces conditions, les animaux atteignent un nombre d'injections comparable à ceux qui n'ont pas subi l'implantation des guide-canules.

A-2 L'activation de la voie du cGMP dans le CPFm ne modifie pas la discrimination envers l'orifice actif

La figure 23 présente la part de NP réalisés dans l'orifice actif (OA) par rapport au nombre total de NP pour les rats soumis à un protocole de FR1 (cocaïne 0,33 mg/kg/injection) avec traitements quotidiens dans le CPFm. Cette variable est un indice de l'acquisition efficace du comportement opérant. Les animaux présentés correspondent à ceux considérés dans les analyses des figures 1a, 2a et 2b de la publication 1 ; les rats effectuant moins de 70 % de NP dans l'OA lors des dernières sessions n'ont pas été pris en compte.

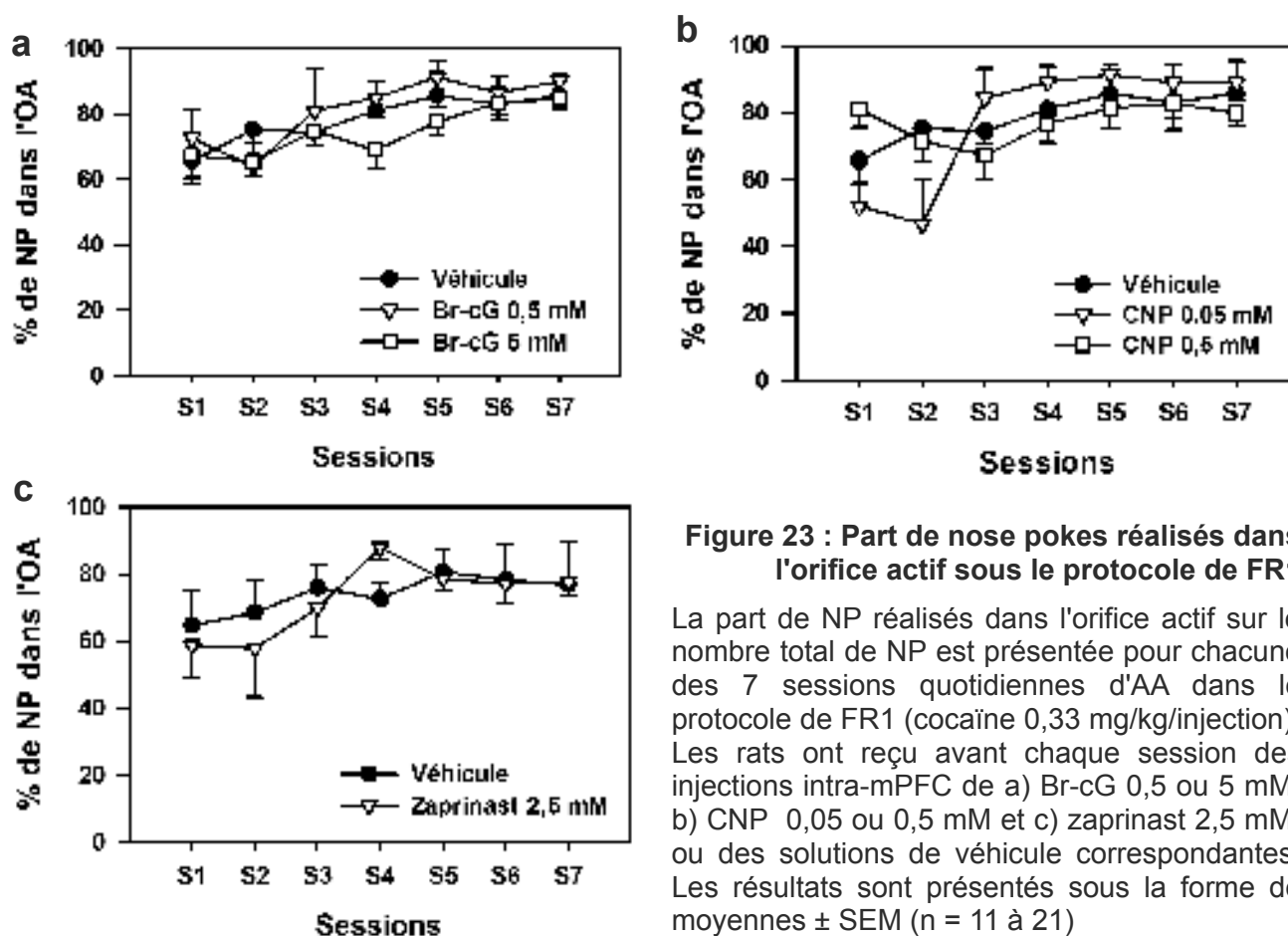


Figure 23 : Part de nose pokes réalisés dans l'orifice actif sous le protocole de FR1

La part de NP réalisés dans l'orifice actif sur le nombre total de NP est présentée pour chacune des 7 sessions quotidiennes d'AA dans le protocole de FR1 (cocaïne 0,33 mg/kg/injection). Les rats ont reçu avant chaque session des injections intra-mPFC de a) Br-cG 0,5 ou 5 mM, b) CNP 0,05 ou 0,5 mM et c) zaprinast 2,5 mM, ou des solutions de véhicule correspondantes. Les résultats sont présentés sous la forme de moyennes \pm SEM (n = 11 à 21)

Les résultats des premières sessions mettent en évidence l'acquisition du comportement opérant par les rats de tous les groupes expérimentaux. Ce comportement se stabilise dès la troisième session. Les rats effectuent plus de 70 % dans l'orifice actif dès la quatrième session, et aucun traitement pharmacologique ne montre d'effet sur la discrimination entre les deux orifices.

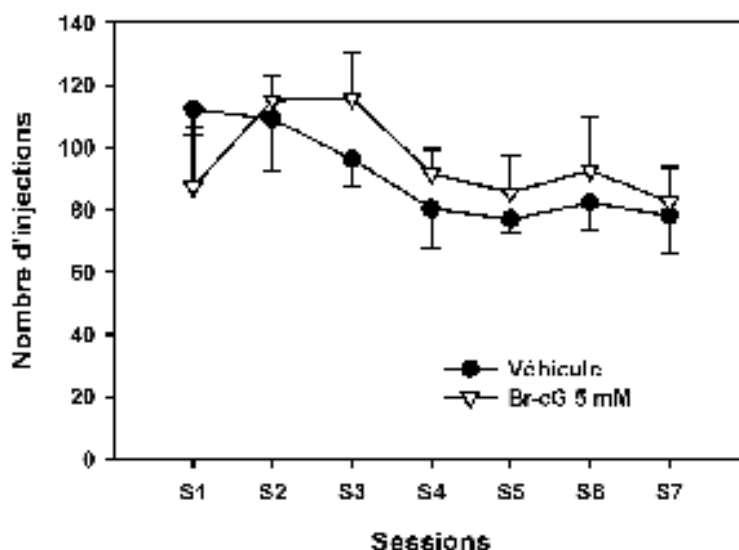
B - Traitements pharmacologiques complémentaires dans le test d'auto-administration

B-1 L'injection de Br-cG dans l'amygdale basolatérale ne modifie pas le comportement d'auto-administration des rats

Un protocole d'injection similaire à celui réalisé dans le CPFm et le NAc (Publication 1, figure 1) a été mené dans l'amygdale basolatérale (BLA). La figure 24 présente les injections de cocaïne déclenchées par les rats dans ces conditions au cours de 7 sessions quotidiennes d'AA sous le protocole de FR1 (cocaïne 0,33 mg/kg/injection).

Figure 24 : Effet d'injections de Br-cG dans la BLA sous le protocole de FR1

Les animaux ont reçu des injections de Br-cG 5 mM ou de NaCl 0,9 % dans la BLA avant chaque session quotidienne d'AA (cocaïne 0,33 mg/kg/injections). Les données sont présentées sous la forme de moyennes \pm SEM (n = 5 pour les deux groupes).



Aucune différence significative n'apparaît entre les rats ayant reçu des injections de Br-cG 5 mM et les animaux contrôles. Toutefois, l'analyse est compliquée par une diminution apparente, bien que non significative, du nombre d'injections, au fur et à mesure des sessions, et ceci pour les deux conditions expérimentales. Ainsi, alors que les animaux déclenchent une moyenne de 111 injections au cours de la deuxième session, ils n'en réalisent plus que 82 en moyenne au septième jour. De plus, les animaux présentent une variabilité importante au sein de chaque groupe. Ces phénomènes sont peut-être dus à la chirurgie stéréotaxique, plus invasive que dans le cas du CPFm.

B-2 L'injection de Br-cG dans le CPFm ne modifie pas le comportement d'auto-administration des rats à une dose de cocaïne plus importante

Afin de mieux cerner l'effet obtenu dans le protocole de FR1, nous avons utilisé une dose de cocaïne plus importante. En effet, la courbe dose-réponse de la cocaïne en FR1 n'est pas linéaire, mais en U inversé. Une diminution du nombre d'injections observée à une dose donnée peut donc correspondre à plusieurs modifications de la courbe, et donc à plusieurs analyses (Figure 25).

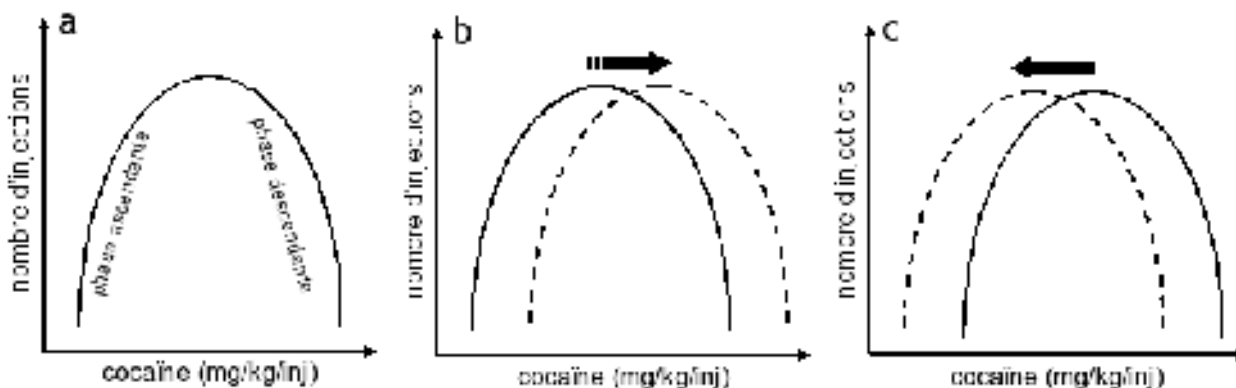


Figure 25 : Courbe dose-réponse théorique de la cocaïne sous le protocole de FR1

a) Allure générale de la courbe dose-réponse de la cocaïne dans le protocole de FR. Les valeurs varient selon les conditions expérimentales (pour la courbe dose-réponse dans nos conditions, voir Précisions méthodologiques, B-4-1). La phase ascendante correspond aux effets renforçants de la drogue ; la phase descendante pourrait correspondre à l'amplification d'effets aversifs ou locomoteurs.

b) et c) Illustrations de modifications possibles de la courbe suite à un traitement. On constate que, selon la dose considérée, une diminution du nombre d'injections peut correspondre à un décalage vers la droite ou vers la gauche de la courbe, avec des interprétations comportementales différentes.

Nous avons utilisé un protocole similaire à celui présenté dans la figure 1a de la publication 1, avec une concentration de cocaïne de 0,75 mg/kg/injection. Les rats ont effectué 7 sessions quotidiennes d'AA sous le protocole de FR1 et reçu, dans le CPFm, des injections de Br-cG 0,5 ou 5 mM, ou de NaCl 0,9 %, préalablement à chaque session. La figure 26a présente le nombre moyen d'injections déclenchées par les animaux ; la figure 26b propose une modification, suite aux injections de Br-cG, de la courbe dose-réponse correspondant à nos conditions expérimentales.

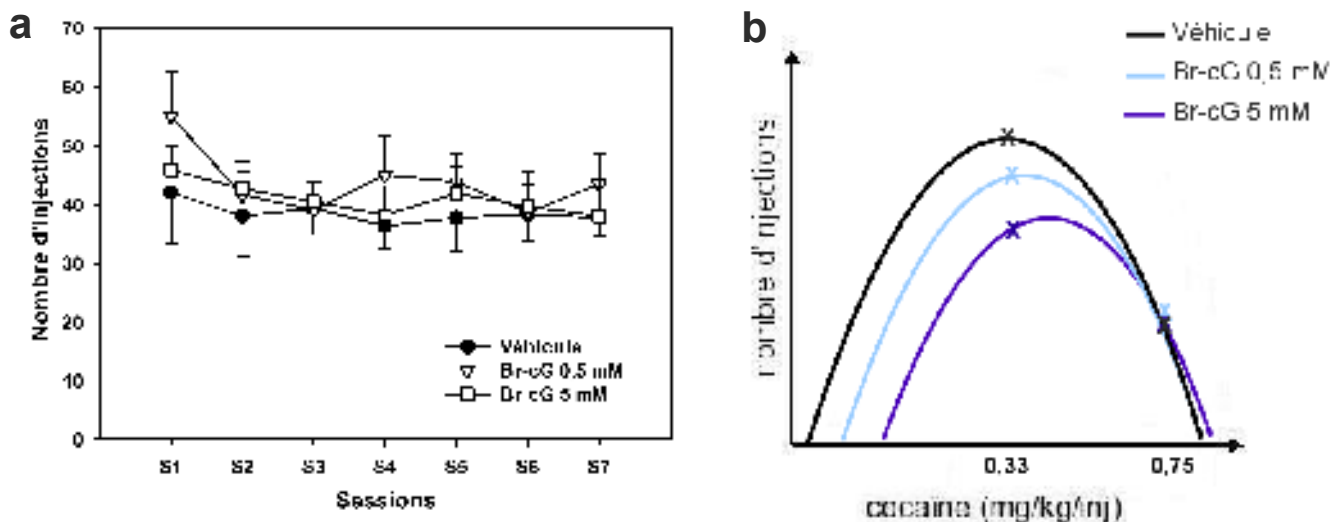


Figure 26 : Effet d'une dose de cocaïne plus forte sous le protocole de FR1

a) Nombre d'injections de cocaïne déclenchées pendant les 7 sessions quotidiennes. Les rats ont reçu des injections de Br-cG 0,5 ou 5 mM ou de NaCl 0,9 % dans le CPFm avant chaque session. Les données sont présentées sous la forme de moyennes \pm SEM (n = 6 à 7).

b) Modification de la courbe dose-réponse de la cocaïne par les injections de Br-cG dans le CPFm. Cette figure correspond à une hypothèse basée sur le nombre d'injections obtenu à la septième session d'AA sous les deux doses de cocaïne testées.

Lorsqu'une dose de cocaïne plus forte a été testée, les rats traités par le Br-cG dans le CPFm n'ont pas diminué le nombre d'injections déclenchées ; leur comportement n'a pas différé de celui des rats contrôles. Cette donnée nous permet de proposer une modification de la courbe dose-réponse qui corresponde aux résultats obtenus avec les deux doses de cocaïne. Ainsi, nos résultats indiquent une translation de la courbe vers la droite, accompagnée d'un décalage général vers le bas.

B-3 Un traitement à la papavérine ne modifie le comportement d'auto-administration ni dans le protocole de FR1 ni dans un protocole de PR

Nous avons testé l'effet d'un autre inhibiteur de PDE, la papavérine. Ce composé inhibe principalement la PDE10A, qui est enrichie dans le striatum. Il a été injecté par voie intrapéritonéale (i.p.) avant chaque session quotidienne d'AA (cocaïne 0,33 mg/kg/injection). Deux doses de papavérine ont été utilisées : 5 et 30 mg/kg. La dose la plus forte a induit une catatonie transitoire, disparaissant après 20 minutes mais gênant le déroulement de l'AA pendant cette période. Les injections ont donc été réalisées 30 min avant que l'animal soit placé dans la chambre de test. Les rats ont été soumis au protocole de FR1 (Figure 27a) et à un protocole de PR (Figure 27b), comme décrit dans la publication 1 et en B-4-2 des *Précisions méthodologiques*.

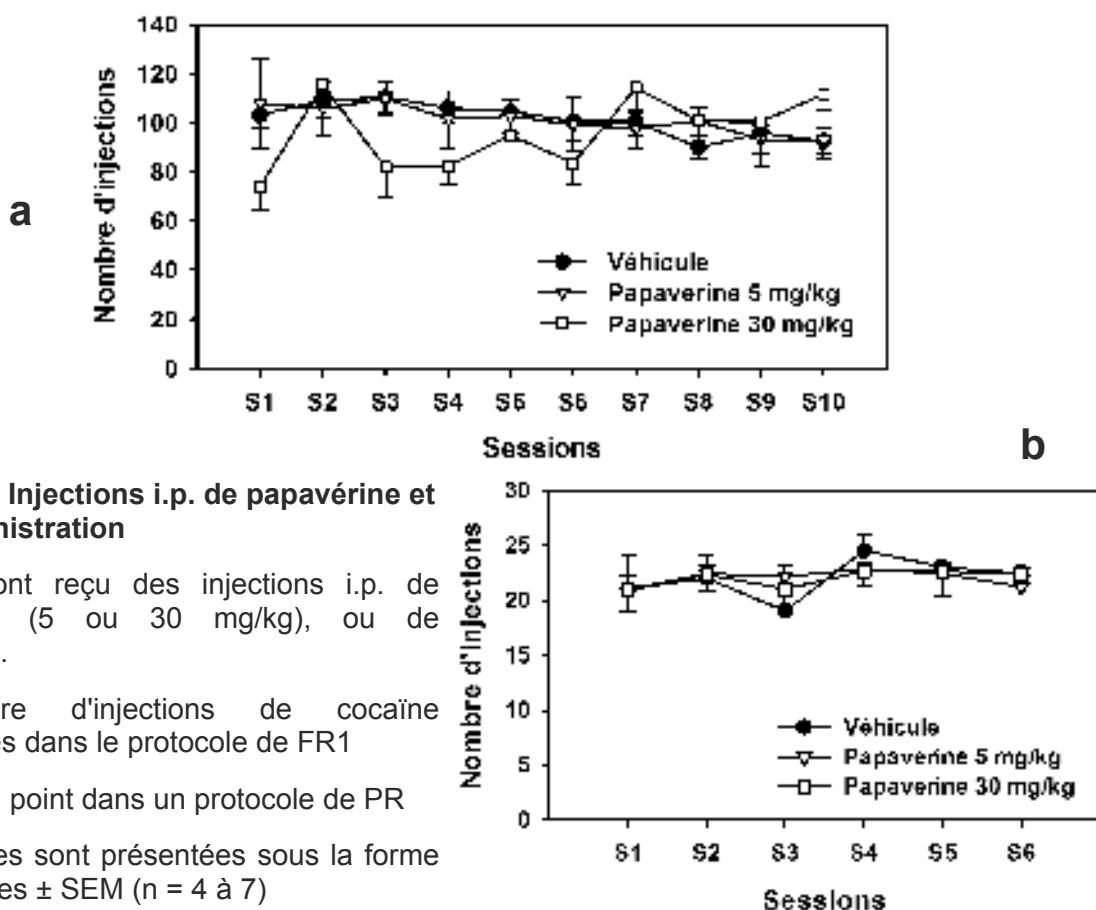


Figure 27 : Injections i.p. de papavérine et auto-administration

Les rats ont reçu des injections i.p. de papavérine (5 ou 30 mg/kg), ou de NaCl 0,9 %.

a) Nombre d'injections de cocaïne déclenchées dans le protocole de FR1

b) Breaking point dans un protocole de PR

Les données sont présentées sous la forme de moyennes \pm SEM (n = 4 à 7)

Nos résultats n'ont pas mis en évidence de différence dans le comportement d'auto-administration des rats suite au traitement par la papavérine. L'analyse des résultats des rats ayant reçu la dose la plus forte de 30 mg/kg est compliquée par une instabilité apparente du comportement, qui est peut-être due aux effets pro-catatoniques du composé.

B-4 La combinaison d'injections de Br-cG et de zaprinast dans le CPFm ne diminue pas le comportement des rats sous le protocole de FR1

Dans l'optique d'amplifier l'effet de nos traitements dans le CPFm, nous avons testé l'injection consécutive de zaprinast 2,5 mM et de Br-cG 5 mM. Ces deux traitements diminuent séparément le nombre d'injections de cocaïne déclenchées par les rats sous le protocole de FR1 (Publication 1, figures 1a et 2b respectivement). Les données obtenues après 7 jours d'AA (cocaïne 0,33 mg/kg/injection) sont présentées dans la figure 28.

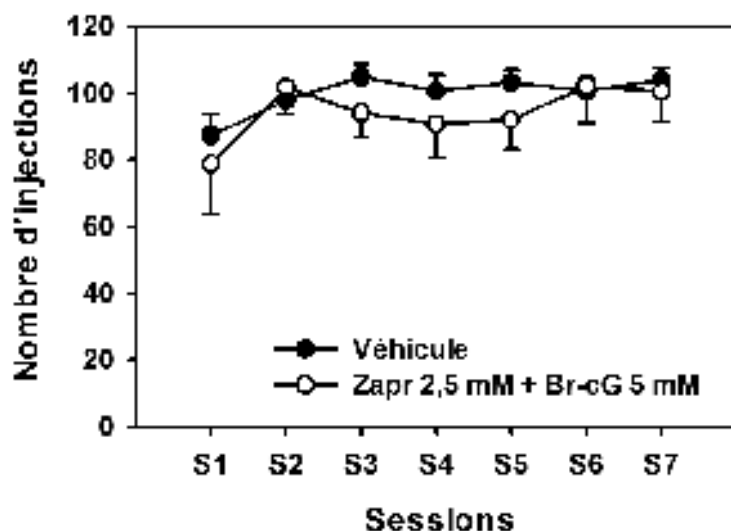


Figure 28 : Effet d'injections combinées de zaprinast et de Br-cG dans le CPFm sous le protocole de FR1

Les animaux ont reçu dans le CPFm l'injection consécutive de zaprinast 2,5 mM et de Br-cG 5 mM, ou des solutions de véhicule correspondantes, avant chaque session quotidienne d'AA (cocaïne 0,33 mg/kg/injection). Les données sont présentées sous la forme de moyennes \pm SEM (n = 5 à 7).

Étonnamment, la combinaison des deux traitements n'a pas induit d'effet sur le nombre d'injections déclenchées par les rats.

C - Analyses immunohistochimiques

Nous supposons que les effets des modulations de la voie du cGMP sur le comportement d'auto-administration sont principalement dus à l'activation de la PKG. Afin d'explorer des pistes de mécanismes sous-jacents, nous avons recherché les niveaux d'expression des formes phosphorylées de protéines impliquées dans les régulations épigénétiques. En effet, la protéine MeCP2 est régulée par phosphorylation, et cette modification covalente module également les propriétés d'histones telles que l'histone H3. La figure 29 présente la quantification des niveaux de formes phosphorylées de ces protéines mesurées dans le CPu, le NAc, et le CPFm ; comme pour les figures 4-6 de la publication 1, l'étude a été menée à l'issue de 7 sessions d'AA avec injections, dans le CPFm, d'une solution de CNP 0,5 mM ou de la solution de véhicule correspondante.

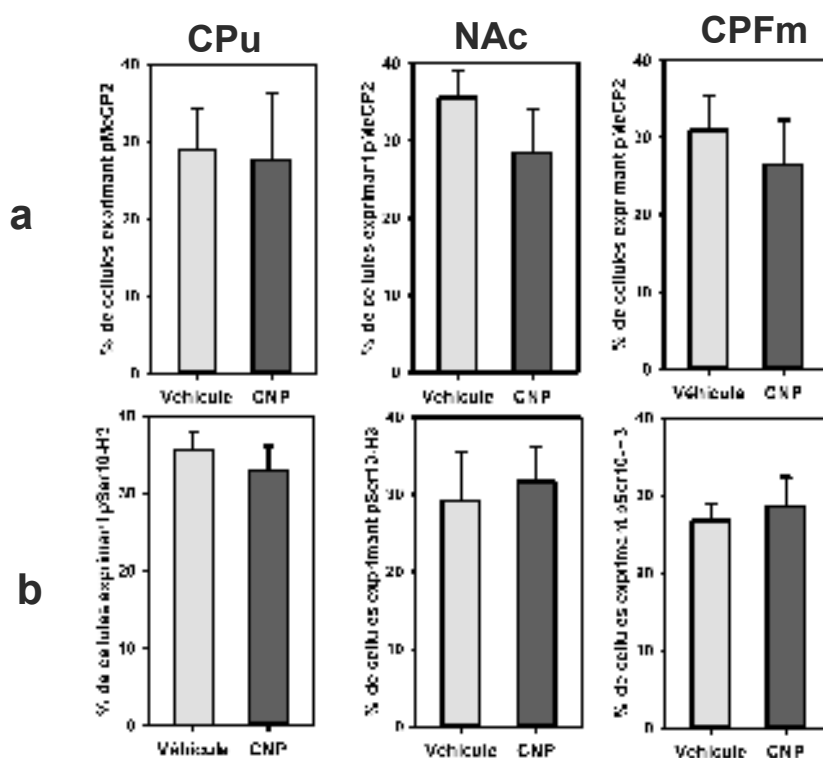


Figure 29 : Quantification des cellules exprimant les formes phosphorylées de MeCP2 et de l'histone H3

a) Quantification du marquage dirigé contre la forme phosphorylée de MeCP2 (Ser80).

b) Quantification du marquage dirigé contre la forme phosphorylée de l'histone H3 (Ser10).

Les quantifications ont été réalisées dans le CPu, le NAc et le CPFm. Les données sont présentées sous la forme de moyennes \pm SEM (n = 4 à 6).

L'expression des formes phosphorylées de MeCP2 (Ser80) et H3 (Ser10) n'a pas été modifiée chez les rats traités par des injections de CNP dans le CPFm par rapport aux animaux contrôles.

Publication 2

Overexpression of cyclic GMP-dependent protein kinase reduces MeCP2 and HDAC2 expression

Elodie Deschatrettes, Peggy Jouvert, Jean Zwiller

Soumis pour publication

Résumé :

Le monoxyde d'azote NO et le peptide natriurétique de type C, CNP, exercent leurs effets par la stimulation de la voie du GMP cyclique (cGMP), qui inclut l'activation de protéine kinases dépendantes du cGMP (PKG). Le présent rapport montre que l'activation de la PKG par l'application locale de 8-bromo-cGMP dans le noyau caudé-putamen réduit l'expression des marqueurs épigénétiques MeCP2 (methyl-CpG-binding protein 2) et HDAC2 (histone désacétylase 2) dans les aires de projection dopaminergiques de rats traités à la cocaïne. Un effet de moindre amplitude a été observé chez des rats n'ayant pas reçu d'injection de cocaïne. Nous avons également étudié l'effet de la surexpression de la PKG en injectant un vecteur contenant l'ADNc du gène humain de la PKG-I α dans le caudé-putamen ou dans l'aire tegmentale ventrale. L'injection du vecteur dans le caudé-putamen a réduit les paramètres épigénétiques plus fortement que l'analogue du cGMP seul. L'effet a été aboli par l'injection d'un inhibiteur sélectif de la PKG, ce qui confirme qu'il est basé sur des mécanismes de phosphorylation dépendants de la kinase. Dans le cerveau adulte, MeCP2 et HDAC2 modulent des fonctions dynamiques telles que la formation de la mémoire et la plasticité synaptique. La réduction de leur expression par la PKG suggère que la voie du cGMP affecte les processus cognitifs par un mécanisme comprenant le complexe MeCP2/HDAC2 et le contrôle subséquent de la répression transcriptionnelle.

NOTE : La version définitive de cet article est disponible sous la référence suivante :

Deschatrettes E, Jouvert P, Zwiller J (2012) Overexpression of cyclic GMP-dependent protein kinase reduces MeCP2 and HDAC2 expression. *Brain Behav* 2(6):732-40

Overexpression of cyclic GMP-dependent protein kinase reduces MeCP2 and HDAC2 expression

Elodie Deschatrettes, Peggy Jouvert and Jean Zwiller*

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

**Corresponding author: Dr J. Zwiller, LINC, UMR 7237 CNRS, Université de Strasbourg, 12 rue Goethe, 67000 Strasbourg, France*

Tel. +33 368 85 19 78;

Fax: +33 368 85 19 58;

E-mail: zwiller@neuro-cnrs.unistra.fr

Running Title: Cyclic GMP regulates the MeCP2 epigenetic marker

Keywords: cGMP-dependent protein kinase; cocaine; cyclic GMP; DNA methylation; histone deacetylase; methyl-CpG binding protein MeCP2

Abstract

Nitric oxide NO and the C-type natriuretic peptide, CNP, exert their action via stimulation of the cyclic GMP (cGMP) signaling pathway, which includes the activation of cGMP-dependent protein kinases (PKG). The present report shows that activation of PKG by local application of 8-bromo-cGMP in the caudate-putamen reduced the expression of the epigenetic markers, MeCP2 (methyl-CpG-binding protein 2) and HDAC2 (histone deacetylase 2), in dopaminergic projection areas of cocaine-treated rats. An effect of lesser amplitude was observed when rats were not injected with cocaine. We also studied the effect of PKG overexpression by injecting a plasmid vector containing the human PKG-I α cDNA either in the caudate-putamen or in the ventral tegmental area. Injection in the caudate-putamen reduced the epigenetic parameters with higher amplitude than the cGMP analog. The effect was abolished by the injection of a selective PKG inhibitor, confirming that it was due to PKG-dependent phosphorylation. Since MeCP2 and HDAC2 modulate dynamic functions in the adult brain such as memory formation and synaptic plasticity, the down-regulation of expression by PKG suggests that the cGMP pathway affects cognitive processes through a mechanism that comprises the MeCP2/HDAC2 complex and the subsequent control of gene silencing.

Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (cGMP) is an intracellular second messenger that is synthesized in response to the activation of either soluble guanylyl cyclase by nitric oxide (Chinkers & Garbers, 1991, Miki *et al.*, 1977) or the membrane-bound guanylyl cyclase GC-B primarily by the C-type natriuretic peptide CNP (Potter *et al.*, 2006). Cyclic GMP effects are predominantly mediated by the activation of cGMP-dependent protein kinases (PKGs). Two distinct mammalian PKGs, PKG-I and PKG-II, have been identified, as well as two splice variants of PKG-I (PKG-I α and I β). Both PKG-I and -II are found in the brain; PKG-I is highly expressed in cerebellar Purkinje cells and, to a lesser extent, in striatal medium spiny neurons (Ariano, 1983, De Camilli *et al.*, 1984, Jarchau *et al.*, 1994, Lohmann *et al.*, 1981). PKGs are implicated in various aspects of brain physiology, including development (Guan *et al.*, 2009), neurotransmitter release (Guevara-Guzman *et al.*, 1994, Lin *et al.*, 1995) and synaptic plasticity (Zhuo *et al.*, 1994).

Alteration of gene expression in response to drugs of abuse is thought to underlie the persistent behavioral changes associated with chronic use (Nestler, 2001). Epigenetic mechanisms that regulate the accessibility of genes to the transcriptional machinery in the mature brain control changes in gene expression produced by cocaine (Cassel *et al.*, 2006, Colvis *et al.*, 2005). In the nucleosome, DNA methylation and post-translational modifications of histones are the major epigenetic mechanisms. Histone acetylation on lysine residues in the amino-terminal tail is the most frequent post-translational histone modification. In general, increased histone acetylation leads to DNA relaxation and elevated transcriptional activity, whereas decreased acetylation brought about by histone deacetylases (HDACs) results in tighter DNA coiling and gene silencing (De Ruijter *et al.*, 2003, Jenuwein & Allis, 2001). We have shown that repeated administration of cocaine induced the expression of the methylated DNA binding protein, MeCP2 (methyl-CpG-binding protein 2) therefore increasing HDAC activity (Cassel *et al.*, 2006). MeCP2 expression and histone acetylation have also been implicated in long-term changes produced by cocaine self-administration (Host *et al.*, 2011) and nicotine place preference (Pastor *et al.*, 2011) in rats.

In previous studies, we have shown that activation of the cGMP pathway attenuated several effects of cocaine. Intracerebroventricular application of CNP reduced the increase in synaptic dopamine and immediate early gene expression produced by cocaine (Thiriet *et al.*, 2001). CNP also decreased alcohol intake when injected directly into dopaminergic brain areas (Romieu *et al.*, 2008). Moreover, a similar inhibitory effect on cocaine-induced *egr-1* expression and locomotor activity was obtained by simply activating or overexpressing PKG-I in dopaminergic structures, using the polyethyleneimine delivery system (Jouvert *et al.*, 2004). The delivery protocol produced an active enzyme with the expected Mr of 75,000 and the highest kinase activity was observed 24 h after plasmid delivery. When the PKG plasmid was injected into the VTA, it was expressed in dopaminergic neurons, and injection into the CPu produced an over-expression of the kinase in medium-spiny GABAergic neurons and in cholinergic and GABAergic interneurons (Jouvert *et al.*, 2004). In the present study, we investigated whether activating the cGMP pathway would also influence the expression of the epigenetic parameters, MeCP2 and HDAC2.

Methods

Animals

Male Wistar rats (Janvier, France), weighing 220-270 g, were housed in standard cages under a fixed 12 h light/dark cycle (lights on at 07:00 AM) with *ad libitum* access to food and water. 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 Animales*; permission 67-165 to JZ). For implantation of guide cannulae, (ext. diameter, 0.6 mm; int. diameter, 0.4 mm; Plastics One, Roanoke, VA, USA), rats were anesthetized with ketamine (100 mg/kg). A guide cannula was stereotaxically implanted into either the caudate putamen (CPu; 0.3 mm anterior to bregma; 3.5 mm lateral to bregma; 4.8 mm ventral from the skull) or the ventral tegmental area (VTA; 2.3 mm anterior to lambda; 0.5 mm lateral to bregma; - 7.7 mm ventral to skull surface) (Paxinos & Watson, 1997). The guide cannula was permanently fixed to the skull with stainless steel screws and methacrylate cement. Experiments were performed 4 days after implantation. The correct placement of guide

cannulae was verified by histological examination of tissue sections. Data from rats in which placements were not localized in the intended site were not included in any analyses.

PKG activation and overexpression

For PKG overexpression, plasmid/polyethyleneimine (PEI) complexes were injected into the CPu (2 μ l) or VTA (0.6 μ l), as indicated above. After being complexed with PEI in 5% glucose solution, a p513 vector (7.5 μ g) containing the human PKG-I α cDNA and vector lacking a cDNA insert were injected into the right hemi-structure and left hemi-structure, respectively, as described previously (Jouvert *et al.*, 2004). PKG was activated by the subsequent injection of a 20 mM 8-bromo-cyclic GMP (Br-cG; Sigma, USA) in a saline solution, or inhibited by the injection under identical conditions of a 2 mM KT5823 (Calbiochem, USA) solution, according to the schedule shown in Figure 1. The injection volume was 0.5 μ l for the VTA and 1 μ l for the CPu. Control microinjections were equivalent volumes of vehicle. Cocaine (Cooper, France) was injected intraperitoneally at the dose of 20 mg/kg.

Immunohistochemistry

Animals were given an overdose of pentobarbital (100 mg/kg, ip) 45 min following cocaine injection and were then perfused transcardially with 100 ml saline followed by 2% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS; 0.1 M; pH 7.2; 250 ml). The brains were removed, kept overnight at 4°C in 15% sucrose, frozen in isopentane at -40°C, and stored at -80°C. Coronal sections (20- μ m thick) were obtained using a Microm HM560 cryostat.

Immunohistochemistry was performed as described previously (Cassel *et al.*, 2006). Briefly, brain sections were incubated with the following primary polyclonal antibodies: anti-MeCP2 (1:150 dilution; Millipore, Billerica, MA) or anti-HDAC2 (1:200 dilution, Millipore). Sections were then successively incubated with biotinylated donkey anti-rabbit IgG (1:200 dilution) and with an avidin-biotin-peroxidase complex (Vectastain ABC kit, Vector Lab., Burlingame, CA). Staining was revealed with the chromagen 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride and H₂O₂. Sections were then incubated in a 2.5 μ M bisbenzimidazole (Hoechst 33258; Sigma-Aldrich) solution to label nuclei and the slides were coverslipped with Mowiol. Staining was observed under a fluorescent Leitz DM RB binocular microscope

(Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Two photomicrographs of the same field were taken with an AxioCam camera (Carl Zeiss, Jena, Germany); one was used to count the total number of nuclei stained with Hoechst 33258 and the other to count the number of immunoreactive cells for a given antigen. Positively stained nuclei or cells were counted, using the plugin Cell Counter tool of ImageJ 1.43 software (NIH, MA). The percentage of immunoreactive cells was calculated from counts on at least 800 cells by an investigator blind to the experimental conditions. For each measure, 6 to 8 counts were performed on 4 sections from 3 to 6 different rats.

Statistical analysis

Results are expressed as means \pm SEM. Protein expression was analyzed by a one-way ANOVA on the data from each treatment. Student-Newman-Keuls post-hoc tests were performed when required, and significance was set at $p \leq 0.05$. Statistical analysis was performed using SigmaStat (Systat software, Chicago, IL).

Results

Effect of PKG activation and over-expression on MeCP2 expression in cocaine-treated rats

The effect of PKG activation on MeCP2 expression was studied by injecting 8-Bromo-cGMP (Br-cG), a cell permeant analog of cGMP, into the CPu or the VTA, according to the protocol described in Figure 1. Previous studies have shown that a 15-min period was sufficient to optimally activate the kinase enzymatic activity. The inhibitor was injected 10 min before the activator, to ensure that the enzyme was in an inhibited state before injection of the activator. Quantitative analysis of cells expressing MeCP2 in the dorsal CPu, in the shell subregion of the nucleus accumbens (NAc) and in the prefrontal cortex (PFCx) in response to intra-CPu injection of Br-cG is shown in Figure 2. Acute cocaine treatment did not significantly increase MeCP2 expression. Activation of PKG by Br-cG micro-injection into the CPu caused a 63% decrease in MeCP2 levels in the dorsal CPu. A smaller decrease was found in the NAc shell (32%) and in the PFCx (21%) under the same conditions.

The effect of PKG over-expression on MeCP2 expression was studied after injection of the PKG plasmid into the same site than that used for Br-cG injection, according to the protocol described in Figure 1. In the CPu, the overexpression of the kinase by itself reduced MeCP2 levels by 42%; full activation of the exogenous kinase by Br-cG further reduced MeCP2 expression to a very low level. The effect was less pronounced in the two other structures (Fig. 2). All these effects were blocked by the prior injection of KT5823, a selective inhibitor of PKG. Figure 3 shows quantitative analysis of MeCP2 expression in the CPu, NAc and PFCx in response to intra-VTA injections. Surprisingly, MeCP2 expression was not significantly reduced in any of the structures even though PKG overexpression produced a decrease in the PFCx.

Effect of PKG activation and over-expression on HDAC2 expression in cocaine-treated rats

Quantitative analysis of cells expressing HDAC2 in the dorsal CPu, NAc shell and PFCx in response to intra-CPu injection of the plasmids and of Br-cG is shown in Figure 4. Data were obtained from immunohistochemistry experiments of coronal sections adjacent to those taken for measuring MeCP2 levels. As was the case for MeCP2, HDAC2 levels were not modified by the cocaine injection. When Br-cG was micro-injected into the CPu, HDAC2 levels were decreased by about 50% in CPu and PFCx and by about 40% in the NAc. The reduction was completely reversed when the selective PKG inhibitor was injected before Br-cG.

In the PFCx, and to a lesser degree in the CPu and NAc, activation by Br-cG of the exogenous kinase resulted in a significant inhibition of HDAC2 expression, but the overexpression of the kinase by itself did not reduce levels of the deacetylase (Fig. 4). Again, the effects of the activation/overexpression were totally blocked by the injection of KT5823. Figure 5 shows quantitative analysis of HDAC2 expression in the dorsal CPu, NAc shell and PFCx in response to intra-VTA injections. As was the case for MeCP2 expression, HDAC2 levels were not modified.

Illustration of the PKG effects on MeCP2 and HDAC2 expression

Figure 6 illustrates MeCP2 and HDAC2 immunostaining in the dorsal CPu of rats that received intra-CPu injections, according to the schedule shown in Figure 1. Both MeCP2 and HDAC2 immunoreactivities were exclusively found in cell nuclei, as expected for proteins that bind DNA or histones. Overexpression of the kinase alone reduced MeCP2 and HDAC2

labeling. Activation of endogenous plus overexpressed kinase reduced the labeling further. The reduction in protein expression was reversed by KT5823, and there was an increase in the number of immunoreactive cells; the labeling intensity of both proteins was somewhat enhanced.

Effect of PKG activation on MeCP2 and HDAC2 expression in control rats

We checked whether PKG activation reduced the protein expression also in rats that were not injected with cocaine. Quantitative analysis of cells expressing MeCP2 and HDAC2 in the dorsal CPu, NAc shell and PFCx in response to intra-CPu injection of Br-cG is shown in Figure 7. Activation of PKG by Br-cG micro-injection into the CPu caused a decrease in MeCP2 and HDAC2 levels in all the structures without reaching statistical significance in the PFCx for MeCP2. Overall, a lesser decrease was found when compared with the situation in which rats were given a cocaine injection. These effects were also blocked by the prior injection of the selective PKG inhibitor KT5823.

Discussion

The present report shows that the activation and/or overexpression of PKG in the CPu strikingly reduced the expression levels of the epigenetic parameters, MeCP2 and HDAC2, in dopaminergic projection areas of cocaine-treated rats. Both proteins were reduced maximally in about 30% of the cells, regardless of the percentage of cells that expressed each protein in control conditions. Studies from several laboratories, including ours, have shown that cocaine-induced modulation in gene expression is achieved, at least partially, via epigenetic regulation (Cassel *et al.*, 2006, Kumar *et al.*, 2005). For instance, DNA methylation and histone acetylation have been implicated in stimulant-related behavioral and molecular adaptations. We found that cocaine increased MeCP2 and HDAC2 nuclear expression, in response to repeated experimenter- or self-administered exposure (Cassel *et al.*, 2006, Host *et al.*, 2011), supporting the hypothesis that epigenetic regulation plays an important role in the development and maintenance of drug addiction. In the present study, PKG was found to reduce the expression of these epigenetic factors, suggesting that activators of the cGMP

pathway may be used as general pharmacological tools for down-regulating the MeCP2/HDAC2 complex. This is comforted by the fact that PKG activation also reduced MeCP2 and HDAC2 expression in rats that were not injected with cocaine, although to a lesser extent.

In previous studies, we showed that activation of the cGMP pathway was sufficient to attenuate the increase in extracellular dopamine, immediate early gene expression and locomotor activation produced by cocaine (Jouvert *et al.*, 2004, Thiriet *et al.*, 2001). Since we used a technique to overexpress the PKG in which highest kinase activity was produced 24 h after plasmid delivery (Jouvert *et al.*, 2004), only effects of an acute injection of cocaine could be determined. Surprisingly, the simple activation of the endogenous PKG in the CPU was sufficient to decrease MeCP2 and HDAC2 protein expression in the dorsal CPU, NAc shell and PFCx in this short timescale. This may result from a decreased protein expression, possibly due to the phosphorylation, and subsequent inactivation of an element of the transcriptional machinery. Alternatively, it may result from the PKG-induced degradation of the proteins. It is also possible that phosphorylation by PKG of the proteins or of some partner proteins may have induced the formation of alternate complexes that prevented accessibility of MeCP2 and HDAC2 to their respective antibodies. This latter possibility is particularly attractive since both proteins were similarly regulated. The effect on both proteins was abolished by the injection of the selective PKG inhibitor, KT5823, confirming that the effect was due to PKG-dependent phosphorylation.

The effect on MeCP2 expression was greatly potentiated in the three structures examined by the addition and subsequent activation of exogenous overexpressed PKG. Surprisingly, the latter effect was not observed when HDAC2 expression was measured. It is noteworthy that other HDACs, such as HDAC5 or HDAC11, which belong to different classes of histone deacetylases that are also regulated by cocaine (Host *et al.*, 2011), were not modulated by PKG (data not shown), suggesting a unique role of HDAC2 in this process.

In contrast, injection of the PKG vector or Br-cG into the VTA failed to alter MeCP2 or HDAC2 levels in any of the brain sites. The data probably underscore a differential action of PKG at the pre- and postsynaptic levels. Effectively, the observation that only intra-CPU infusions produced the effect probably denotes that it results from a PKG-modified signal transduction pathway taking place in neurons post-synaptic from the dopaminergic neuron. Indeed, in an electron microscopy study we showed that PKG was localized mainly in post-

synaptic sites (data not shown). These findings are consistent with our previous results that also failed to find an effect of intra-VTA infusions of Br-cG on cocaine-induced *egr-1* expression in the CPu (Jouvert *et al.*, 2004).

When the PKG vector was injected into the CPu, over-expression of the kinase was found primarily in GABAergic medium-spiny neurons (Jouvert *et al.*, 2004). Activation of the cGMP pathway in these neurons probably modulates GABA release in many projection areas and therefore disrupts the striato-nigro-thalamic loop. Modulation of neurotransmitter release by cGMP has been demonstrated in many systems; cGMP activators like natriuretic peptides inhibit various secretory responses such as aldosterone and catecholamines (Babinski *et al.*, 1995, Samson *et al.*, 1993), whereas endogenous NO modulates the release of several neurotransmitters, including catecholamines, excitatory and inhibitory amino acids and serotonin (Guevara-Guzman *et al.*, 1994, Prast & Philippu, 2001). Accordingly, disturbance of the striato-nigro-thalamic loop will have an impact on cortical neurons. One of these consequences would be the degradation or down-regulation of the MeCP2/HDAC2 complex. The precise mechanism of this proposed effect is currently unknown.

HDAC2 was chosen because it is part of a complex composed also of Sin3A and MeCP2, after the latter binds to methylated DNA. The resulting HDAC activity thus carries transcriptional silencing to the corresponding genes (Yang & Seto, 2008). The enzyme is also highly expressed in the mesolimbic pathway (Broide *et al.*, 2007, Cassel *et al.*, 2006). HDAC2 has been reported to regulate memory formation and synapse plasticity in mature neurons (Grissom & Lubin, 2009, Guan *et al.*, 2009, Pastor *et al.*, 2011). Similarly, MeCP2 is highly expressed in mature neurons where it is required for modulating dynamic functions of the adult brain and mutations within the gene are known to be associated with Rett syndrome (Nelson *et al.*, 2006, Zhou *et al.*, 2006). The fact that PKG was able to down-regulate the expression of both MeCP2 and HDAC2 proteins when injected into the CPu suggests that the cGMP pathway affects cognitive processes through a mechanism that comprises the MeCP2/HDAC2 complex and the gene silencing that it controls. Interestingly, *egr-1* may be one of the genes silenced by this mechanism, since levels of AcH3 and AcH4 were increased in the *egr-1* promoter in HDAC2 KO mice (Guan *et al.*, 2009). The fact that activation of PKG reduced both HDAC2 levels and *egr-1* induction suggests that the MeCP2/HDAC2 complex regulates *egr-1* expression, at least to some extent.

Phosphodiesterases have recently been suggested as potential new targets for cognition enhancement (Reneerkens *et al.*, 2009). Results of the present study are consistent with this idea and suggest that amplification of the intracellular availability of the second messenger cGMP by phosphodiesterase inhibitors have therapeutic potential for the treatment of neuropsychiatric disorders involving disturbances of mood, emotion, and cognition, including drug addiction.

Acknowledgments: We thank M. O. Revel for help with immunological techniques, and Pr. S. Schenk, Victoria University of Wellington, New Zealand, for critical reading of the manuscript. We gratefully acknowledge funding provided by the Association Française du Syndrome de Rett (AFSR).

Conflict of interest: The authors declare no competing financial interest.

References

- Ariano, M.A. (1983) Distribution of components of the guanosine 3',5'-phosphate system in rat caudate-putamen. *Neuroscience*, **10**, 707-723.
- Babinski, K., Haddad, P., Vallerand, D., McNicoll, N., de Lean, A. & Ong, H. (1995) Natriuretic peptides inhibit nicotine-induced whole-cell currents and catecholamine secretion in bovine chromaffin cells: evidence for the involvement of the atrial natriuretic factor R2 receptors. *J Neurochem*, **64**, 1080-1087.
- Broide, R.S., Redwine, J.M., Aftahi, N., Young, W., Bloom, F.E. & Winrow, C.J. (2007) Distribution of histone deacetylases 1-11 in the rat brain. *J Mol Neurosci*, **31**, 47-58.
- 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.
- Chinkers, M. & Garbers, D.L. (1991) Signal transduction by guanylyl cyclases. *Annu Rev Biochem*, **60**, 553-575.
- Colvis, C.M., Pollock, J.D., Goodman, R.H., Impey, S., Dunn, J., Mandel, G., Champagne, F.A., Mayford, M., Kozus, E., Kumar, A., Renthal, W., Theobald, D.E. & Nestler, E.J. (2005) Epigenetic mechanisms and gene networks in the nervous system. *J Neurosci*, **25**, 10379-10389.
- De Camilli, P., Miller, P.E., Levitt, P., Walter, U. & Greengard, P. (1984) Anatomy of cerebellar Purkinje cells in the rat determined by a specific immunohistochemical marker. *Neuroscience*, **11**, 761-817.
- de Ruijter, A.J., van Gennip, A.H., Caron, H.N., Kemp, S. & van Kuilenburg, A.B. (2003) Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J*, **370**, 737-749.
- Grissom, N.M. & Lubin, F.D. (2009) The dynamics of HDAC activity on memory formation. *Cell Science*, **6**, 44-48.
- Guan, J.S., Haggarty, S.J., Giacometti, E., Dannenberg, J.H., Joseph, N., Gao, J., Nieland, T.J., Zhou, Y., Wang, X., Mazitschek, R., Bradner, J.E., DePinho, R.A., Jaenisch, R. & Tsai, L.H. (2009) HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature*, **459**, 55-60.
- Guevara-Guzman, R., Emson, P.C. & Kendrick, K.M. (1994) Modulation of in vivo striatal transmitter release by nitric oxide and cyclic GMP. *J Neurochem*, **62**, 807-810.
- Host, L., Dietrich, J.B., 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**, 222-229.
- Jarchau, T., Hausler, C., Markert, T., Pohler, D., Vanderkerckhove, J., De Jonge, H.R., Lohmann, S.M. & Walter, U. (1994) Cloning, expression, and in situ localization of rat intestinal cGMP-dependent protein kinase II. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**, 9426-9430.
- Jenuwein, T. & Allis, C.D. (2001) Translating the histone code. *Science*, **293**, 1074-1080.

- Jouvert, P., Revel, M.O., 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**, 10716-10725.
- Kumar, A., Choi, K.H., Renthal, W., Tsankova, N.M., Theobald, D.E., Truong, H.T., Russo, S.J., Laplant, Q., Sasaki, T.S., Whistler, K.N., Neve, R.L., Self, D.W. & Nestler, E.J. (2005) Chromatin remodeling is a key mechanism underlying cocaine-induced plasticity in striatum. *Neuron*, **48**, 303-314.
- Lin, A.M., Kao, L.S. & Chai, C.Y. (1995) Involvement of nitric oxide in dopaminergic transmission in rat striatum: an in vivo electrochemical study. *J Neurochem*, **65**, 2043-2049.
- Lohmann, S.M., Walter, U., Miller, P.E., Greengard, P. & De Camilli, P. (1981) Immunohistochemical localization of cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, **78**, 653-657.
- Miki, N., Kawabe, Y. & Kuriyama, K. (1977) Activation of cerebral guanylate cyclase by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun*, **75**, 851-856.
- Nelson, E.D., Kavalali, E.T. & Monteggia, L.M. (2006) MeCP2-dependent transcriptional repression regulates excitatory neurotransmission. *Curr Biol*, **16**, 710-716.
- Nestler, E.J. (2001) Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat Rev Neurosci*, **2**, 119-128.
- Pastor, V., Host, L., Zwiller, J. & Bernabeu, R. (2011) Histone deacetylase inhibition decreases preference without affecting aversion for nicotine. *J Neurochem*, **116**, 636-645.
- Paxinos, G. & Watson, C. (1997) *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 3rd edn, Academic Press, Orlando.
- Potter, L.R., Abbey-Hosch, S. & Dickey, D.M. (2006) Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr Rev*, **27**, 47-72.
- Prast, H. & Philippu, A. (2001) Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog Neurobiol*, **64**, 51-68.
- Reneerkens, O.A., Rutten, K., Steinbusch, H.W., Blokland, A. & Prickaerts, J. (2009) Selective phosphodiesterase inhibitors: a promising target for cognition enhancement. *Psychopharmacology (Berl)*, **202**, 419-443.
- Romieu, P., Gobaille, S., Aunis, D. & Zwiller, J. (2008) Injection of the neuropeptide CNP into dopaminergic rat brain areas decreases alcohol intake. *Ann NY Acad Sci*, **1139**, 27-33.
- Samson, W.K., Huang, F.L. & Fulton, R.J. (1993) C-type natriuretic peptide mediates the hypothalamic actions of the natriuretic peptides to inhibit luteinizing hormone secretion. *Endocrinology*, **132**, 504-509.
- Thiriet, N., Jouvert, P., Gobaille, S., Solov'eva, O., Gough, B., Aunis, D., Ali, S. & Zwiller, J. (2001) C-type Natriuretic Peptide (CNP) regulates cocaine-induced dopamine increase and immediate early gene expression in rat brain. *Eur. J. Neurosci*, **14**, 1702-1708.
- Yang, X.J. & Seto, E. (2008) The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**, 206-218.

Zhou, Z., Hong, E.J., Cohen, S., Zhao, W.N., Ho, H.Y., Schmidt, L., Chen, W.G., Lin, Y., Savner, E., Griffith, E.C., Hu, L., Steen, J.A., Weitz, C.J. & Greenberg, M.E. (2006) Brain-specific phosphorylation of MeCP2 regulates activity-dependent Bdnf transcription, dendritic growth, and spine maturation. *Neuron*, **52**, 255-269.

Zhuo, M., Hu, Y., Schultz, C., Kandel, E.R. & Hawkins, R.D. (1994) Role of guanylyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase in long-term potentiation. *Nature*, **368**, 635-639.

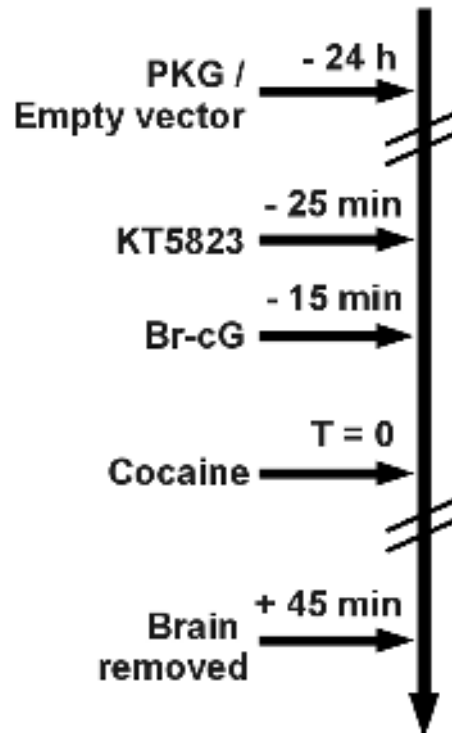


Figure 1: Schematic representation of the injection schedule used for PKG overexpression. Rats were given injections of a vector containing the PKG-I cDNA (0.5 μg) into the right VTA (0.6 μl) or CPu (2 μl) and of 0.5 μg of vector lacking a cDNA insert into the left corresponding structure. Twenty-four hours later, they were injected bilaterally with 2 nmol of KT5823 or saline followed 10 min later by injections of 20 nmol of Br-cG or saline into the same structures. Injection volumes were 0.5 μl for VTA and 1 μl for CPu. Finally, they received an intraperitoneal injection of 20 mg/kg cocaine. Rats were killed and the brains removed 45 min after cocaine injection.

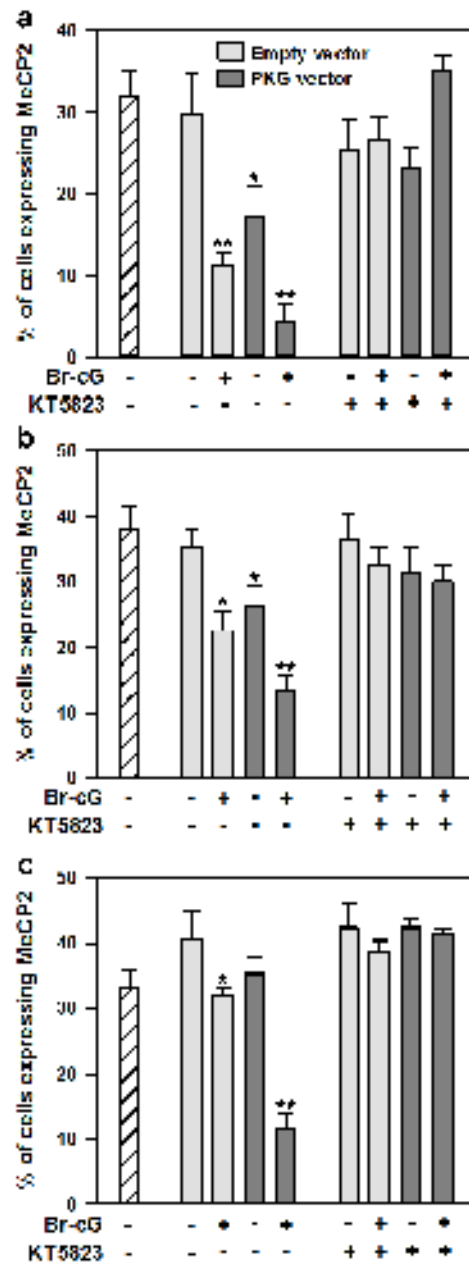


Figure 2: Quantification of cells expressing MeCP2 in response to the activation or overexpression of PKG in the CPu. Quantification was carried out in (a) the dorsal CPu, (b) the NAc shell and (c) the PFCx (n = 3 rats in the groups that were injected with KT5823 and n = 6 in the other groups). Treatment of rats and immunohistochemistry were performed as described under Methods and in Fig. 1. Hatched bars on the left represent the values obtained in control rats that were not treated with cocaine. Nuclei were stained with bisbenzimidazole (Hoechst 33258). The percentage of immunoreactive cells was calculated from 6 to 8 counts on three serial sections. *P < 0.05, **P < 0.001, comparison with control rats injected with the empty vector and saline (ANOVA followed by Student-Newman-Keuls post hoc test).

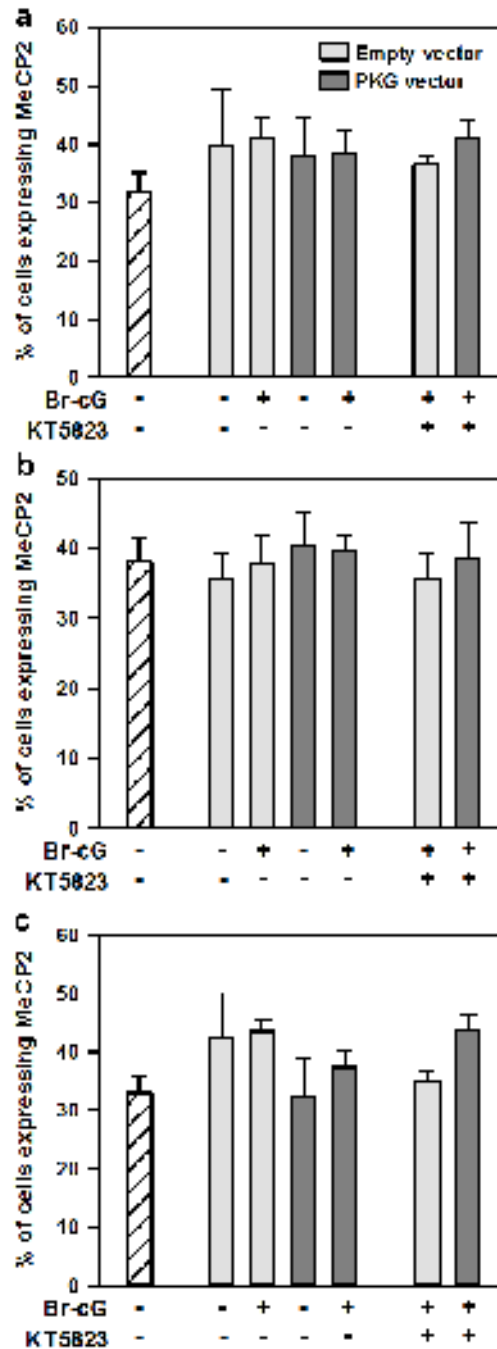


Figure 3: Quantification of cells expressing MeCP2 in response to the activation or overexpression of PKG in the VTA. Quantification was carried out in (a) the dorsal CPU, (b) the NAc shell and (c) the PFCx ($n = 3$ in the groups that were injected with KT5823 and $n = 6$ in the other groups). Hatched bars on the left represent the values obtained in control rats that were not treated with cocaine. The percentage of immunoreactive cells was calculated from 5 to 7 counts on three serial sections.

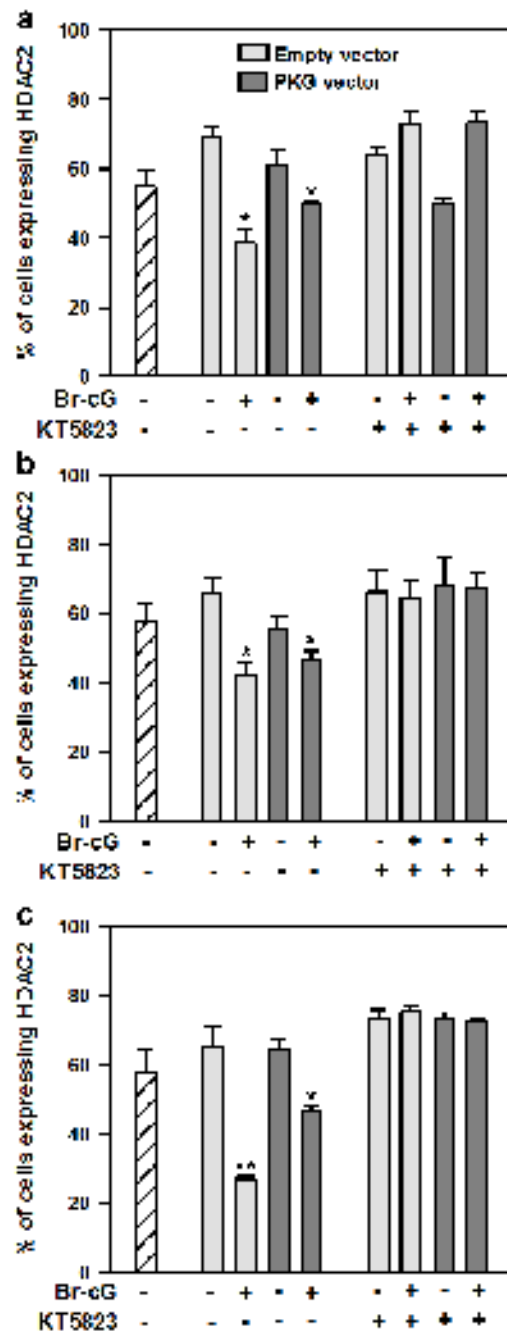


Figure 4: Quantification of cells expressing HDAC2 in response to the activation or overexpression of PKG in the CPu. Quantification was carried out in (a) the dorsal CPu, (b) the NAc shell and (c) the PFCx ($n = 3$ in the groups that were injected with KT5823 and $n = 6$ in the other groups). Hatched bars on the left represent the values obtained in control rats that were not treated with cocaine. The percentage of immunoreactive cells was calculated from 6 to 8 counts on three serial sections. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, comparison with control rats injected with the empty vector and saline (ANOVA followed by Student-Newman-Keuls post hoc test).

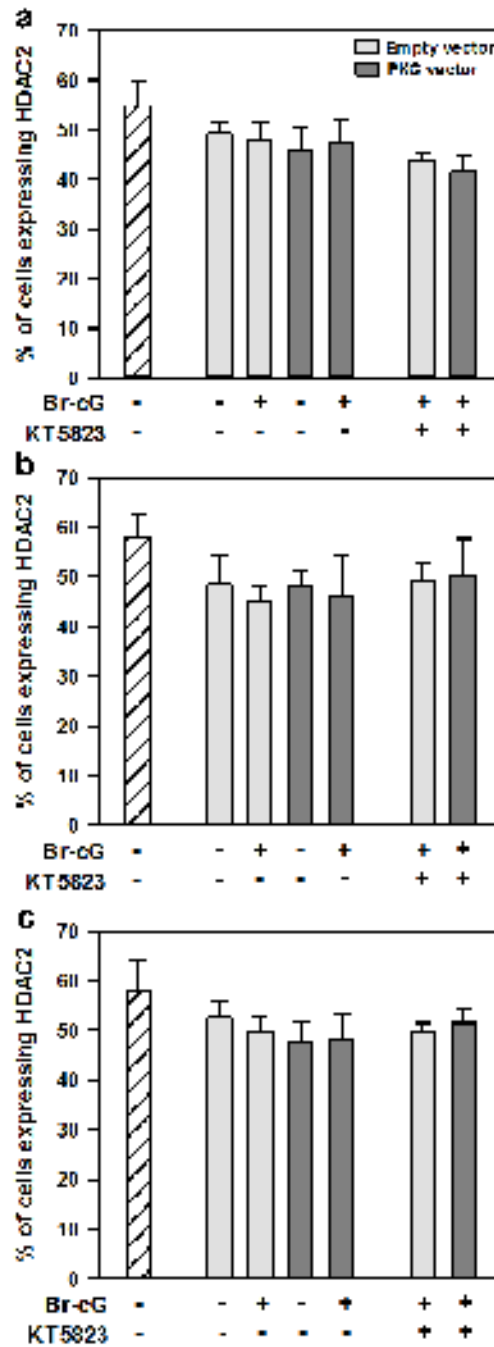


Figure 5: Quantification of cells expressing HDAC2 in response to the activation or overexpression of PKG in the VTA. Quantification was carried out in (a) the dorsal CPU, (b) the NAc shell and (c) the PFCx (n = 3 in the groups that were injected with KT5823 and n = 6 in the other groups). Hatched bars on the left represent the values obtained in control rats that were not treated with cocaine. The percentage of immunoreactive cells was calculated from 4 to 7 counts on three serial sections.

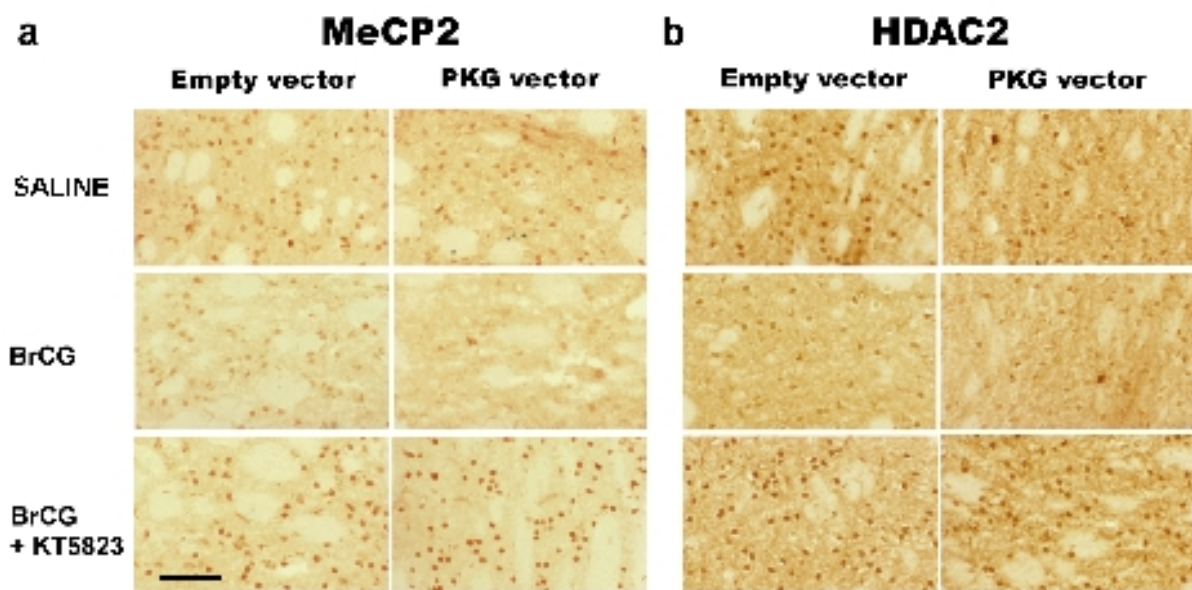


Figure 6: Photomicrographs showing (a) MeCP2 and (b) HDAC2 immunoreactivity in response to the activation or overexpression of PKG in the CPU. Treatment of rats and immunohistochemistry were performed as described under Methods and Fig. 1. Coronal tissue sections (20 μm) were incubated with polyclonal antibodies against MeCP2 or HDAC2. Antibody binding was detected with secondary biotinylated antibody and peroxidase reaction. Scale bar applicable to all micrographs, 50 μm .

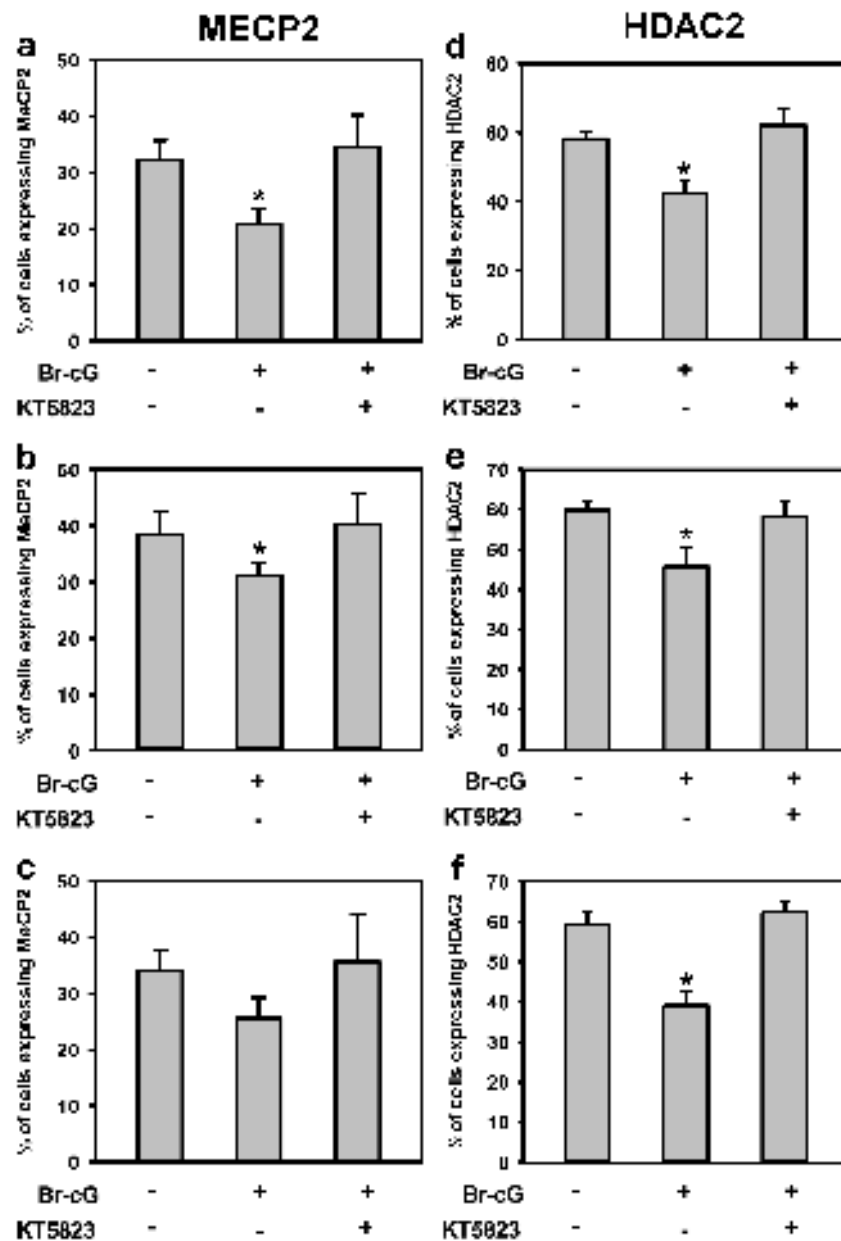


Figure 7: Quantification of cells expressing MeCP2 and HDAC2 in response to the activation of PKG in control rats. Br-cG was injected into the CPu. MeCP2 quantification was carried out in (a) the dorsal CPu, (b) the NAc shell and (c) the PFCx of rats that were not given further cocaine injection (n = 4 per group). HDAC2 quantification was carried out in adjacent sections from (d) the dorsal CPu, (e) the NAc shell and (f) the PFCx of the same rats. The percentage of immunoreactive cells was calculated from 4 to 6 counts on three serial sections.

Discussion générale

A - GMP cyclique et auto-administration de cocaïne

B - GMP cyclique et régulations épigénétiques

A - GMP cyclique et auto-administration de cocaïne

A-1 Effet d'activateurs de la voie du cGMP dans le protocole de FR1

Des études antérieures de notre équipe ont montré que la modulation de la voie du cGMP permettait de contrecarrer différents effets aigus de la cocaïne ; nous avons utilisé l'auto-administration intraveineuse chez le rat (AA), alors récemment développée au sein du laboratoire, pour rechercher une éventuelle action sur les effets comportementaux, renforçants, de la drogue.

L'AA est un test comportemental complexe qui offre de nombreuses possibilités pour étudier les propriétés renforçantes, voire toxicomanogènes, d'une substance. Le protocole expérimental utilisé dans ce travail est basé sur le comportement naturel d'exploration du rat, l'action à la base de l'AA étant le nose poke (NP), c'est-à-dire l'entrée du museau du rat dans un orifice. De plus, nous avons choisi le protocole de ratio fixe 1 (FR1) comme premier protocole d'exploration car il permet une exposition optimale à la substance auto-administrée ; sous ce protocole, un seul NP actif déclenche une injection. Dans ce contexte, les animaux acquièrent très vite le comportement d'AA, puisqu'ils effectuent un nombre d'injections stable dès la troisième session (Figure 21). Nous avons choisi d'utiliser une concentration de cocaïne de 0,33 mg/kg/injection, qui correspond à la dose induisant le comportement maximum en AA dans nos conditions expérimentales (Figure 35).

Afin d'étudier l'influence du cGMP sur le comportement d'AA de cocaïne, trois approches complémentaires ont été utilisées, basées sur l'injection de trois composés pharmacologiques : le 8-bromo-cGMP (Br-cG) est un activateur de la PKG qui traverse les membranes ; le peptide natriurétique de type C (CNP) est le ligand physiologique de la guanylate cyclase membranaire GC-B ; enfin, le zaprinast inhibe la dégradation du cGMP par les phosphodiésterases. Dans les trois cas, le traitement exacerbe la transduction portée par le nucléotide cyclique.

Les traitements ont été réalisés *in situ* dans différentes structures cérébrales, afin d'obtenir des effets spécifiques. Il est intéressant de noter que la chirurgie stéréotaxique en elle-même n'a pas d'effet sur le comportement, comme cela est illustré pour des injections dans le cortex préfrontal médian (CPFm) en figure 22. Au cours de nos expériences, les rats contrôles ont néanmoins été traités par des injections de la solution véhicule correspondante, c'est-à-dire une solution soit de NaCl 0,9 %, soit de DMSO 50 %.

A-1-1 Injections intracérébrales de Br-cG dans le protocole de FR1

a) Spécificité de l'effet par rapport à la structure

L'injection quotidienne de Br-cG dans le CPFm a réduit le nombre d'injections déclenchées par les rats dans le protocole de FR1 lorsqu'on le compare à celui des rats contrôles. Cet effet n'apparaît que progressivement et dépend de la dose utilisée : une dose de 0,5 mM n'a pas produit d'effet significatif, tandis que la dose plus forte de 5 mM a induit une diminution significative dès la quatrième session quotidienne (Publication 1, figure 1a).

Un traitement similaire effectué au niveau du noyau accumbens (NAc) n'a pas induit de modulation du comportement d'AA (Publication 1, figure 1b), même à une dose très élevée de Br-cG. De la même manière, nous n'avons noté aucune différence entre des rats contrôles et ceux traités par le composé lorsqu'il a été injecté dans le noyau basolatéral de l'amygdale (BLA), une structure dont l'importance dans la mise en place de la dépendance est de plus en plus nette (Figure 24). Dans ce cas, toutefois, une diminution générale de l'activité des rats au fur et à mesure des sessions ne nous permet pas de conclure sans ambiguïté ; des études complémentaires permettraient de mieux cerner l'effet du traitement. Néanmoins, pour la suite de notre étude, nous avons choisi de nous focaliser sur le CPFm comme cible des traitements.

Différentes études indiquent que le cGMP réduit la libération de DA dans des modèles cellulaires et *in vivo* (Guevara-Guzman *et al.*, 1994, Samson *et al.*, 1988) ; des activateurs de cette voie de signalisation sont d'ailleurs en mesure de réduire la libération de DA évoquée par la cocaïne, comme l'a démontré une étude antérieure de notre équipe (Thiriet *et al.*, 2001). Il est donc surprenant que des injections d'un analogue du cGMP directement dans le NAc n'aient, dans notre étude, pas eu d'effet sur le comportement des rats en AA de cocaïne. Toutefois, les études précédentes ont été menées avec des injections intracérébroventriculaires (i.c.v.) ; il est donc possible que la diminution de la libération de DA observée dans le striatum soit la conséquence de processus ayant lieu dans d'autres structures cérébrales. Il est possible aussi que la diminution de DA synaptique dans le NAc induite par l'injection de Br-cG n'était pas suffisante pour impliquer des modifications du comportement.

D'autres données indiquent un effet différentiel de la voie du cGMP selon la structure cérébrale : alors que des injections i.c.v. de CNP réduisent l'expression de gènes précoces induite par la cocaïne dans le NAc et le CPU, ce n'est pas le cas du CPFm où l'on note même une induction de ces gènes par le peptide seul. Des effets semblables surviennent suite à des injections intra-CPU

ou intra-VTA du peptide (Jouvert *et al.*, 2004). Ces données peuvent sembler contradictoires au vu de nos résultats ; néanmoins, il s'agit là de modulations faisant suite à des injections aiguës, alors que l'effet comportemental observé dans le test d'AA n'apparaît qu'après plusieurs jours, et se base donc probablement sur d'autres processus apparaissant à plus long terme.

b) Analyses complémentaires

Notons que le traitement n'a pas modifié la capacité des rats à discriminer l'orifice actif et l'orifice inactif. Les animaux effectuant moins de 70 % de NP dans l'orifice actif n'ont pas été pris en compte ; sachant que le nombre de rats éliminés des analyses est similaire dans les différentes conditions expérimentales, nous avons constaté que la part de NP effectués dans l'orifice actif ne varie pas selon les groupes (Figure 23a), montrant que l'injection de Br-cG ne perturbe pas le conditionnement opérant. Comme le montrent les figures 23b et 23c, cette remarque est valable pour les autres activateurs de la voie du cGMP étudiés, CNP et zaprinast.

La signification d'une diminution du nombre d'injections sous un protocole de FR1 est sujette à débat ; elle correspond soit à une diminution des propriétés renforçantes de la cocaïne, soit à une augmentation de ses propriétés aversives. La courbe dose-réponse de la cocaïne dans le test d'auto-administration en FR1 n'est pas linéaire, mais dite en U inversé (LeSage *et al.*, 1999 ; figure 25a). Cette relation reflète l'interaction entre les effets renforçants de la cocaïne, d'une part, et ses effets locomoteurs et aversifs, d'autre part. Selon la dose de cocaïne utilisée, une diminution du nombre d'injections peut correspondre à des décalages de la courbe vers la droite, la gauche, ou encore vers le bas, chacune de ces transformations correspondant à des interprétations différentes, voire contradictoires. Toutefois, la dose de cocaïne de 0,33 mg/kg/injection que nous avons utilisée correspond au maximum de la courbe dans nos conditions expérimentales (Précisions méthodologiques, B-4-1). Il est considéré généralement qu'une réduction du nombre d'injections à ce point de la courbe correspond à une diminution des propriétés renforçantes de la drogue. Nous avons néanmoins choisi de tester également une dose plus importante de cocaïne (0,75 mg/kg/injection). Le traitement intra-CPFm par le Br-cG à la dose efficace de 5 mM n'a, dans ce contexte, pas eu d'effet sur le comportement des rats (Figure 26a). On peut conclure que le Br-cG injecté dans le CPFm modifie la courbe dose-réponse en la décalant vers la droite (Figure 26b). Cette translation correspond effectivement à une diminution du pouvoir renforçant de la cocaïne (LeSage *et al.*, 1999).

Selon une autre analyse, si le traitement augmentait les propriétés aversives de la cocaïne, l'effet serait amplifié par une dose de cocaïne plus forte. A contrario, nos résultats obtenus avec les doses de 0,33 et 0,75 mg/kg/injection laissent supposer une diminution des propriétés renforçantes de la drogue, détectable seulement à une dose de cocaïne moins forte. Dans le reste de notre étude, nous utiliserons la dose de cocaïne de 0,33 mg/kg/injection.

A-1-2 Injections de CNP et de zaprinast dans le protocole de FR1

Des traitements complémentaires nous ont permis d'activer la voie du cGMP par la modulation de sa synthèse et de sa dégradation.

a) Injections de CNP dans le CPFm

Le CNP se lie à son récepteur membranaire à activité guanylyl cyclasique, la GC-B. Diverses études démontrent la présence du peptide et de son récepteur dans les structures dopaminergiques (Thiriet *et al.*, 2001 ; Herman *et al.*, 1987), ce qui justifie l'utilisation du peptide pour activer la voie du cGMP dans le CPFm. Les injections intra-CPFm de CNP se sont avérées réduire de façon dose-dépendante le nombre d'injections déclenchées par les rats dans le protocole de FR1 (Publication 1 Figure 2a). Il est intéressant de noter que l'effet obtenu est similaire à celui observé après les injections de Br-cG. Il dépend de la dose et n'apparaît qu'avec une concentration de 0,5 mM de CNP ; il s'installe progressivement au fil des sessions et n'est significatif qu'à partir du cinquième jour ; enfin, l'amplitude est comparable, représentant une baisse d'environ 25 % du nombre moyen d'injections. Ces caractéristiques seront discutées plus bas.

b) Injections de zaprinast dans le CPFm

Le zaprinast est un inhibiteur de l'hydrolyse du cGMP par les phosphodiesterases. Il agit principalement sur la PDE5, responsable d'une grande partie de l'hydrolyse du cGMP ; des études de microdialyse démontrent notamment sa capacité à augmenter les taux de cGMP dans le CPF (Marte *et al.*, 2008). Il constitue donc un traitement complémentaire permettant d'augmenter les taux de cGMP intracellulaires. Comme pour le Br-cG et le CNP, l'injection de zaprinast dans le CPFm avant chaque session d'AA a induit une diminution du nombre d'injections réalisées par les animaux. Cette diminution présente des caractéristiques similaires aux effets des deux autres composés (Publication 1 Figure 2b), aussi bien au niveau de sa cinétique – réduction progressive significative après 5 sessions – qu'au niveau de son amplitude qui est de l'ordre de 25 % par rapport aux rats contrôles lors de la septième session.

c) Injections systémiques de papavérine

Lors de cette étude, un autre inhibiteur de PDE, la papavérine, a été testé. Ce composé a été sélectionné car il est connu pour inhiber principalement la PDE10A, une PDE particulièrement exprimée dans le striatum. Bien qu'injecté en i.p., ce traitement cible donc une structure cérébrale particulière. Aucune des deux doses de papavérine testées n'a produit d'effet significatif sur le comportement d'AA des rats, ni sur 10 jours de FR1 (Figure 27a) ni en PR (Figure 27b). Notons que la dose la plus forte a des effets pro-catatoniques qui ont peut-être dissimulé un effet sur l'auto-administration ; en effet les rats ayant reçu cette dose n'ont pas présenté un comportement homogène ni stable au fil des sessions. Ce résultat rejoint toutefois l'étude d'injections intra-Nac ; dans nos conditions expérimentales, l'activation de la voie du cGMP semble être efficace seulement lorsqu'elle a lieu dans le CPFm.

A-2 Analyse de l'effet obtenu en FR1

Nous avons mis en évidence une diminution des propriétés renforçantes de la cocaïne suite à l'activation de la voie du cGMP dans le CPFm à l'aide de trois approches complémentaires : l'activation de la synthèse du nucléotide, l'inhibition de sa dégradation, et l'activation directe de la PKG par un analogue de synthèse.

Dans les trois cas, la diminution du comportement d'AA des animaux apparaît progressivement et atteint, après 7 sessions, une amplitude de l'ordre de 25 %. Dans l'idée d'amplifier cet effet, nous avons combiné plusieurs traitements. Ainsi, des rats ont reçu consécutivement dans le CPFm une injection de zaprinast et une injection de Br-cG, aux doses efficaces, avant d'être soumis au protocole de FR1. Ce traitement n'a toutefois pas conduit à un effet plus ample que les deux effets considérés séparément (Figure 28). Une première explication de ce résultat surprenant est l'existence de mécanismes de compensation. On sait en effet que les taux du nucléotide cyclique sont maîtrisés efficacement par le biais, notamment, de la régulation de ses enzymes de dégradation, les PDE. On peut donc envisager que la combinaison des deux traitements amène le système à mettre en place des rétrocontrôles dynamiques au sein du CPFm, basés sur une réduction de l'activité des GC ou sur une augmentation de l'activité des PDE, par exemple.

Une deuxième explication pourrait résider dans un effet « butoir » dans lequel l'amplitude de l'ordre de 25 % de la réduction du nombre d'injections correspondrait à une amplitude maximale. Celle-ci correspondrait à une activation maximale de la PKG, donc à une phosphorylation maximale de ses substrats impliqués.

La cinétique de l'effet observé est un autre aspect essentiel à son analyse : plusieurs sessions sont nécessaires pour que les modulations de la voie du cGMP dans le CPFm aient un effet perceptible sur le comportement. Ceci suggère que l'effet des traitements se base sur des processus qui doivent atteindre un certain seuil avant que les conséquences comportementales ne se manifestent ; on peut envisager l'accumulation de la forme phosphorylée d'un substrat de la PKG. Cette apparition progressive des effets comportementaux laisse supposer des mécanismes à moyen terme sous-tendus par des modifications de l'expression de gènes. A ce titre, les régulations épigénétiques sont particulièrement séduisantes, car elles constituent des mécanismes permettant de réguler l'expression génique à long terme. D'autre part, elles pourraient constituer ces modifications dont l'accumulation, au fur et à mesure, mène à des effets comportementaux observables. Cette piste, que nous avons explorée, sera discutée plus loin.

A-3 Activation de la voie du cGMP dans un protocole de PR

L'auto-administration peut être menée sous plusieurs protocoles qui modélisent différents aspects de la consommation de drogue. Ainsi, alors que le FR1 renseigne sur les propriétés appétitives et renforçantes de la substance, les protocoles de ratio progressif (PR) renseignent sur la motivation de l'animal à consommer la substance. Dans ces protocoles, le « travail » que l'animal doit fournir pour obtenir une dose de drogue augmente d'injection en injection ou de jour en jour ; on peut donc en mesurer la valeur maximale, dénommée « point de rupture » ou « breaking point » (BP). Les premiers protocoles de PR étaient basés sur une augmentation du ratio d'un jour à l'autre. Aujourd'hui, les études utilisent plus couramment une augmentation du ratio d'injection en injection, ce qui permet d'obtenir un point de rupture en une seule session et d'observer l'effet d'un traitement sur le BP de session en session (Roberts *et al*, 1989). La progression du ratio peut être arithmétique ou plus complexe. Dans la présente étude, l'équation utilisée est exponentielle (Richardson & Roberts ; 1996) : dans ces conditions, les premières injections sont assez faciles à obtenir pour l'animal, mais le nombre de NP nécessaires croît rapidement (Figure 36).

Nous avons étudié l'influence des injections de Br-cG 5 mM et de CNP 0,5 mM dans ce protocole ; ces doses avaient montré un effet significatif dans le protocole de FR1. Dans les deux cas, des injections effectuées au niveau du CPFm n'ont pas modulé le BP au cours des premières sessions, mais l'ont réduit significativement à partir de la sixième session quotidienne, avec une amplitude similaire pour les deux traitements (Publication 1, figure 3), ce qui permet de conclure que les traitements ont réduit la motivation de l'animal pour la cocaïne.

Ce résultat est intéressant dans la mesure où les traitements sont effectués au niveau du CPFm. En effet, le CPF est impliqué dans les fonctions cognitives supérieures : attention, mémorisation, langage, fonctions exécutives ... Sa partie médiane est considérée comme essentielle dans les processus à la base de l'attribution d'une valeur motivationnelle à certains stimuli. Comme signalé plus haut, de nombreuses études démontrent son importance dans la mise en place de la dépendance. En effet, des perturbations de son fonctionnement sont observées chez les sujets dépendants, et des lésions de cette structure favorisent l'AA de cocaïne chez le rongeur (Contexte scientifique, C-2-3). Ainsi le CPFm aurait un rôle régulateur des comportements de recherche et de consommation de drogue. Nos résultats indiquent que la voie du cGMP participe, au sein de cette structure, aux processus motivationnels.

A-4 Mécanismes d'action du cGMP

Le CNP et le zaprinast induisent l'augmentation du cGMP intracellulaire, et le Br-cG active directement la PKG. Les effets observés sont donc principalement dus à l'activation de la kinase par le nucléotide cyclique, bien que l'implication de PDE régulées par le cGMP ne peut être exclue. Une partie de ces effets pourrait découler de modifications des taux de cAMP, car les voies des deux nucléotides sont étroitement interconnectées.

Une grande partie des effets du cGMP dans l'organisme est néanmoins basée sur l'activation de la PKG, qui phosphoryle diverses cibles. La voie cGMP/PKG est impliquée dans des phénomènes neuronaux fondamentaux. Il est connu, par exemple, que la PKG influence l'activité présynaptique et la potentialisation à long terme (Zhuo *et al.*, 1994). Le cGMP régule la libération de neurotransmetteurs ; ce mécanisme est médié par son action sur les concentrations de calcium libre. En effet, parmi les substrats de la kinase on compte des canaux calcium, le récepteur de l'InsP3 ou encore le phospholambane (Hell *et al.*, 1994 ; Ruth *et al.*, 1993, Decrouy *et al.*, 1995). L'action de la PKG sur ces trois cibles diminue le taux de calcium intracellulaire. Le cGMP est donc en mesure de moduler l'efficacité des neurotransmissions.

La PKG agit également sur les neurones dopaminergiques par son action sur des systèmes tels que celui de DARPP-32. Cette protéine est exprimée par les neurones GABAergiques qui projettent sur les noyaux dopaminergiques. Une fois activée par phosphorylation, elle inhibe la protéine phosphatase de type 1 (PP1) ; ces mécanismes régulent l'efficacité du récepteur du glutamate, donc l'activité des neurones dopaminergiques (Tsou *et al.*, 1993 ; Fienberg *et al.*, 1998).

Ces mécanismes ont été proposés comme pistes pour expliquer les mécanismes sous-tendant l'action du cGMP sur des effets aigus de la cocaïne tels que l'expression de gènes précoces, le pic de DA dans le système mésolimbique, ou l'hyperlocomotion (Jouvert *et al.*, 2004). Mais ces processus peuvent représenter des éléments initiaux à l'origine des adaptations cellulaires responsables des modifications du comportement.

B - GMP cyclique et régulations épigénétiques

B-1 La piste des régulations épigénétiques

Il est aujourd'hui bien accepté que les effets à long terme de la cocaïne impliquent la modulation de l'expression de gènes (Nestler, 2001). En particulier, l'injection de cocaïne induit l'expression de gènes précoces chez le rat, et cet effet peut être bloqué par l'activation préalable de la voie du cGMP (Thiriet *et al.*, 2001 ; Jouvert *et al.*, 2004). Un nombre croissant d'études suggère que le remodelage de la chromatine par les drogues contribue à l'instauration de modifications à long terme de l'expression génique et participe ainsi à la mise en place de la dépendance (Cassel *et al.*, 2006, Levine *et al.*, 2005, Renthall *et al.*, 2007). Nous avons recherché l'éventuelle modulation de différents marqueurs épigénétiques suite aux traitements par les activateurs de la voie du cGMP ; en effet, comme signalé plus haut, ces mécanismes représentent des pistes prometteuses pour relier des processus à court terme comme l'augmentation du taux de cGMP, et les processus à long terme sous-tendant leur influence sur le comportement.

Parmi les modulations épigénétiques les mieux caractérisées à ce jour, la méthylation de l'ADN et l'acétylation des extrémités N-terminales des histones représentent des processus majeurs (Berger, 2002 ; de Ruijter *et al.*, 2003). Les HDAC sont recrutées au niveau de leurs gènes cibles par des complexes de répression comme celui comprenant MeCP2, une protéine de liaison à l'ADN méthylé. Rappelons que la cocaïne induit l'expression de MeCP2 et de HDAC2 au niveau du striatum et du cortex frontal (Cassel *et al.*, 2006). De même, les niveaux d'acétylation des histones H3 sont régulés par un traitement chronique par la cocaïne (Cassel *et al.*, 2006, Wang *et al.*, 2010). C'est pourquoi nous avons étudié l'évolution de ces différents marqueurs dans nos conditions expérimentales, et recherché des indices quant à leur modulation par la PKG.

B-2 Expression de marqueurs épigénétiques et auto-administration avec activation *in situ* de la voie du cGMP

Afin de déterminer dans quelle mesure des régulations épigénétiques participaient à l'action du cGMP sur l'AA, nous avons évalué l'expression de MeCP2, d'HDAC2, des formes acétylées des histones H3 (AcH3) et H4 (AcH4), et des formes phosphorylées de certaines de ces protéines, par une approche immunohistochimique menée sur des coupes de cerveaux de rats issus des expériences d'AA. Nous avons ainsi pu mettre en évidence que les animaux traités par des activateurs de la voie du cGMP dans le CPFm présentent des niveaux d'expression réduits des protéines MeCP2 et HDAC2, corrélés à une augmentation de la présence d'AcH3. Les mesures ont été réalisées dans les structures de projection dopaminergiques CPu, NAc et CPFm. En revanche, nous n'avons pas trouvé de différence dans les niveaux d'expression des formes phosphorylées de MeCP2 et de H3 (Figure 29), ce qui élimine l'hypothèse d'une phosphorylation directe par la PKG. Les modulations d'expression sont observées dans les trois structures étudiées, ce qui suggère des mécanismes plus indirects.

Dans la mesure où les modulations des marqueurs épigénétiques sont concomitantes à des réductions de la quantité de cocaïne consommée, et que ces marqueurs sont connus pour être directement sous le contrôle de la cocaïne, il est difficile d'affirmer que l'activation de la voie du cGMP est une cause des effets observés, ou bien qu'ils découlent de la réduction de la consommation de cocaïne. Toutefois, les études décrites ci-après suggèrent un lien possible.

B-3 Effet de la surexpression et de l'activation de la PKG sur les marqueurs épigénétiques

La publication 2 présente une série d'études portant sur la surexpression et l'activation d'une PKG au sein des structures dopaminergiques, et sur l'expression de marqueurs épigénétiques mesurée lors de ces mêmes traitements. Les études démontrent, d'une part, que la simple activation de la PKG dans le CPu est en mesure de réduire fortement le marquage immunohistochimique de MeCP2 et de HDAC2 dans le CPu lui-même, mais également dans le NAc et le CPFm. Ces résultats ont été obtenus chez des rats ayant reçu une injection i.p. unique de cocaïne 45 min avant le sacrifice, mais sont confirmés chez des rats n'ayant reçu qu'une injection de la solution saline, bien qu'avec une amplitude moindre. L'effet est fortement potentialisé par la surexpression préalable, 24 h avant, de la PKGI- α , et supprimé par l'application de KT5823, un inhibiteur sélectif

de la même kinase, ce qui confirme que c'est bien la PKG qui est responsable des effets observés. Il y a donc une relation causale entre activation de la PKG et diminution des marqueurs épigénétiques.

Au vu de la rapidité de l'effet observé sur le marquage des protéines, (1 h dans le cas de l'activation simple de la PKG par le Br-cG, 24 h dans le cas de la surexpression), il est peu probable qu'il découle d'une modification dans l'expression des gènes correspondants, même si la PKG est en mesure d'influer sur l'expression génique grâce à son action sur différents facteurs de transcription. D'autres hypothèses peuvent être proposées. La PKG pourrait induire la formation de nouveaux complexes protéiques au sein desquels les protéines étudiées ne seraient plus accessibles aux anticorps. On peut également envisager que des phénomènes de dégradation des protéines sont mis en jeu ; en effet, des données montrent que la PKG est capable d'induire la dégradation de protéines en interagissant avec le protéasome (de Frutos *et al.*, 2003).

L'explication impliquant des régulations épigénétiques est particulièrement pertinente pour rendre compte des effets que nous avons observés dans nos études comportementales : les conséquences comportementales de l'activation *in situ* de la voie du cGMP ne sont en effet apparues qu'après plusieurs jours, impliquant à l'évidence des processus à plus long terme. Ces données liant l'activation de la PKG et les protéines MeCP2 et HDAC2 complètent les résultats obtenus en AA et augmentent la probabilité que les effets comportementaux résultent de mécanismes épigénétiques mis en place par le cGMP. Dans ce cas, la stimulation de la voie du cGMP régule négativement le complexe MeCP2/HDAC2. Puisque ce complexe a un rôle de répresseur transcriptionnel, l'effet serait dû à la transcription de gènes à l'origine de la réduction des propriétés renforçantes de la cocaïne.

Quelqu'en soient les mécanismes, nos résultats indiquent un moyen pharmacologique simple pour diminuer, voire abolir, le fonctionnement de ce complexe. Ce dernier point représente une conséquence majeure de ce travail de thèse.

Conclusion générale

Les travaux présentés dans ce mémoire mettent en évidence l'effet du cGMP sur l'action de la cocaïne dans le test comportemental complexe que représente l'auto-administration intraveineuse de drogue. Ainsi, en modulant cette voie de trois manières complémentaires, nous avons démontré que son activation dans le CPFm réduisait à la fois les propriétés renforçantes de la cocaïne et la motivation de l'animal à s'auto-administrer la drogue. Les processus mis en jeu restent à expliciter, mais pointent vers des régulations à long terme, en lien avec la régulation épigénétique de l'expression de gènes. Le complexe répresseur transcriptionnel MeCP2/HDAC est concerné. Ces études complètent des travaux antérieurs de l'équipe montrant que la voie du cGMP représente une piste pertinente dans l'analyse de l'action de la cocaïne.

Les protéines impliquées dans la voie du cGMP sont déjà des cibles de traitements, en développement ou utilisés en clinique, concernant une vaste gamme de pathologies. En particulier, les inhibiteurs de phosphodiésterases ont des applications variées. Ils ont été récemment proposés dans l'amélioration des fonctions cognitives. Les résultats présentés dans ce mémoire suggèrent que des traitements augmentant les taux intracellulaires du cGMP, comme les inhibiteurs des PDE, pourraient trouver également des applications dans le cadre de pharmacothérapies contre la dépendance.

Précisions méthodologiques

A - Animaux et traitements pharmacologiques

B - Auto-administration intraveineuse de cocaïne

C - Études immunohistochimiques

A - Animaux et traitements pharmacologiques

A-1 Animaux

Les études présentées dans ce mémoire ont toutes été réalisées avec des rats mâles adultes de la souche Wistar (160-180 g) provenant de l'élevage Janvier (Le Genest-St-Isle, France). À leur arrivée au laboratoire, les animaux ont été placés par cinq dans des cages standard, pendant au moins deux semaines, afin de les acclimater à leur nouvel environnement. Ils ont eu un accès libre à la nourriture et l'eau et ont vécu avec un cycle journalier contrôlé (12 h de lumière / 12 h d'obscurité, changements à 7h et 19h).

Après les procédures chirurgicales, les animaux ont été placés en cages individuelles, mais de sorte qu'un contact auditif, olfactif et visuel reste possible entre eux. Au moins cinq jours de récupération postopératoire ont été respectés avant le début des injections et/ou des tests comportementaux.

Dans le cadre des procédures d'AA uniquement, les rats ont été placés dès leur arrivée en cycle inversé (lumières éteintes à 7h00 du matin) et les tests comportementaux ont été menés entre 7h et 19h, pendant la période obscure, active, des animaux.

Toutes les procédures impliquant des soins aux animaux ont été réalisées en accord avec la réglementation en vigueur (directive 87848, 1987, Service Vétérinaire de la Santé et de la Protection Animale ; autorisation 67-165 du Dr. Zwiller).

A-2 Composés pharmacologiques

Différentes substances pharmacologiques ont été injectées aux rats. La cocaïne (Sigma-Aldrich, MO, Etats-Unis ou Cooper, Melun, France) a été préparée dans du NaCl 0,9 % et injectée par voie intraveineuse (i.v. ; 54 µl par injection) à des concentrations de 0,33 mg/kg/injection ou 0,75 mg/kg/injection, adaptées tous les 3 jours au poids de chaque animal. Les solutions pour traitements intracérébraux ou intrapéritonéaux (i.p.) ont été préparées comme suit : le 8-bromo-GMP cyclique (Br-cG ; Sigma-Aldrich), le KT5823 (Calbiochem, Merck, Darmstadt, Allemagne) et le peptide natriurétique de type C (CNP-22 ; Sigma-Aldrich) ont été préparés dans du NaCl 0,9 % et injectés in situ dans le CPu, la VTA ou le CPFm (0,5, 5 ou 50 mM pour le Br-cG ; 2 mM pour le KT5823 ; 0,05 ou 0,5 mM pour le CNP) ; le zaprinast (Tocris Bioscience, Minneapolis, Etats-Unis) a été préparé dans du diméthylsulfoxyde (DMSO ; 50%) et injecté dans le CPFm (2,5 mM) ; la

papavérine (Sigma-Aldrich) a été préparée dans du NaCl 0,9 % à 40°C pour aider la dilution, et injectée en i.p. (5 et 30 mg/kg).

Pour la chirurgie, les rats ont été anesthésiés avec l'injection i.p. d'un mélange contenant 0,1 g/ml de kétamine (Imalgène 1000®, Merial, Centravet, Dinan, France) et 2 % de xylazine (Rompun®, Bayer AG, Centravet).

A-3 Chirurgie stéréotaxique et injections intracérébrales

Des guide-canules ont été implantés stéréotaxiquement pour permettre l'injection chronique de produits directement dans des structures cérébrales spécifiques. Pour les rats testés en AA, la pose chirurgicale a été faite à la suite de la mise en place du cathéter intraveineux, avec maintien de la même anesthésie générale toutes les 30 min, afin d'éviter une seconde opération à l'animal.

Les rats ont été anesthésiés et placés dans un cadre stéréotaxique. Un gel de protection (Lacrigel) a été appliqué pour éviter le dessèchement oculaire. Les sutures du crâne ont été mises à jour et les guide-canules (diamètre externe : 0,6 mm) ont été implantés bilatéralement aux coordonnées indiquées dans le tableau 5. Ils ont été maintenus de façon permanente à la surface de la boîte crânienne au moyen de vis et de ciment dentaire (Résine Paladur®, Heraeus Kulzer, Hanau, Allemagne). Le bon placement des guide-canules a été vérifié *a posteriori* par une coloration au violet de crésyl (Figure 30).

Les injections intracérébrales ont été réalisées au moyen de seringues Hamilton de 2 ou 5 µl, à la vitesse de 1 µl/min *via* des canules d'injection calibrées descendant à une coordonnée ventrale de 1 mm en dehors des guide-canules. La canule est laissée en place au moins 1 min après l'injection avant d'être lentement extraite du guide-canule.

| Structure visée | Coordonnées (mm) | | | | Volume injecté (µl) |
|-----------------|-----------------------------|-------------------------|---|-----------|---------------------|
| | Antéro-postérieure / bregma | Médio-latérale / bregma | Dorso-ventrale / surface du crâne au bregma | | |
| | | | Implantation | Injection | |
| CPFm | + 3 | ± 0,8 | - 1,8 | - 2,8 | 2 |
| NAC | + 1,2 | ± 0,8 | - 6 | - 7 | 1 |
| CPu | + 0,3 | ± 3,5 | - 4,8 | - 5,8 | 1 |
| VTA | + 2,3 / lambda | ± 0,5 | - 7,7 | - 8,7 | 0,5 |

D'après Paxinos and Watson, 1997

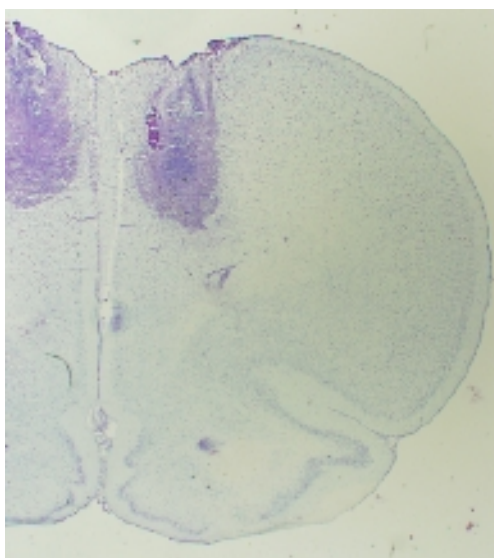


Figure 30 : Vérification de l'implantation des guide-canules

Illustration pour des implantations réalisées au niveau du CPFm.

Des coupes ont été effectuées comme indiqué en C-1 au niveau apparent des guide-canules et laissées à sécher pendant 14 jours à température ambiante.

Elles ont été traitées dans des bains d'alcool de concentration décroissante, puis colorées par une solution de violet de crésyl 0,5 %. Elles ont ensuite été déshydratées par des bains de concentration croissante, puis trempées dans du xylène avant d'être couvertes d'une lamelle.

L'observation a été effectuée comme décrit en C-3.

A-4 Traitements pharmacologiques aigus

La publication 2 présente des analyses effectuées sur des rats soumis à des traitements aigus visant l'activation de la PKG, son inhibition, ou sa surexpression.

A-4-1 Transfert de gènes *in vivo*

Dans le laboratoire, le gène humain codant la PKG-I α a été cloné et inséré dans un plasmide p513, un vecteur eucaryote d'expression transitoire (Esteve et al., 2001). Sept et demi μ g de ce plasmide ont été complexés à 15 nmoles de polyéthylèneimine (PEI) de 22 kDa (obtenu du laboratoire du Pr Behr, UMR 7514, Faculté de pharmacie, Illkirch) dans une solution de glucose 5 % (complexe PEI/ADN avec un rapport charges positives apportées par le PEI / charges négatives apportées par l'ADN égal à 5). Une solution similaire contenant le plasmide « vide », c'est-à-dire sans le gène codant la PKG-I α , a été utilisée comme contrôle.

A-4-2 Planning des injections

Les animaux sont traités selon le protocole présenté en figure 31 dans le cas des études de surexpression de la PKG. Dans une expérience complémentaire (Publication 2, figure 7), des rats ayant reçu des injections de KT5823 et de Br-cG selon le même protocole ont ensuite reçu une injection i.p. de NaCl 0,9 %, 45 min avant d'être sacrifiés. L'injection de vecteur est effectuée 24 h avant les autres traitements pour correspondre à l'amplitude maximale de la surexpression, comme décrit précédemment (Jouvert *et al.*, 2004).

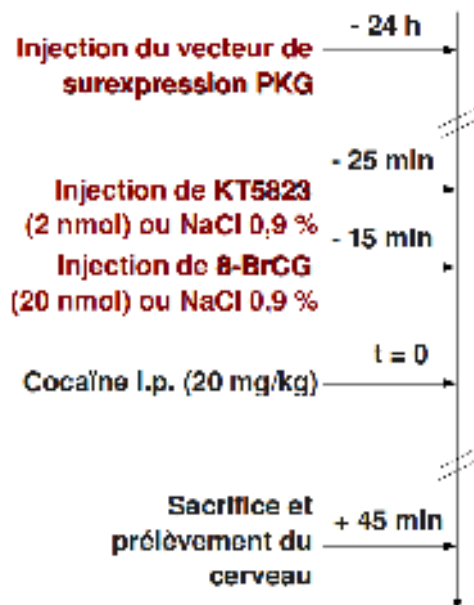


Figure 31 : Surexpression / activation de la PKG

La solution contenant le vecteur de surexpression est injectée dans les structures cérébrales (CPu et VTA) du côté droit de l'encéphale ; le vecteur vide est injecté du côté gauche. Après 24h, les animaux reçoivent des injections de KT5823 et de Br-cG dans les mêmes structures, puis une injection i.p. de cocaïne. Les injections intracérébrales sont détaillées en A-3.

Quarante-cinq min plus tard les rats sont sacrifiés et leurs cerveaux prélevés selon le protocole décrit en C-1.

B - Auto-administration intraveineuse de cocaïne

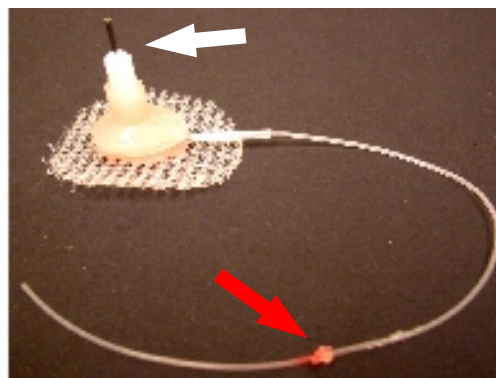
B-1 Construction du cathéter intraveineux

Le cathéter consiste en un tube de Silastic (Plastics One, VA, Etats-Unis) de 12 cm de long, 0,3 mm de diamètre interne et 0,63 mm de diamètre externe, attaché à un guide-canule à pas de vis de 22 gauges (Plastics One) plié à angle droit et fixé sur un morceau circulaire de maille de mersilène® (Ethicon, Johnson and Johnson, PA, Etats-Unis) de 2,5 cm de diamètre grâce à du ciment dentaire (Résine Paladur®). Le pas de vis est externalisé au niveau du dos de l'animal afin de permettre les injections en laissant l'animal libre de ses mouvements. Le système peut être fermé hermétiquement par le biais d'un capuchon de plastique protégé par un manchon métallique vissable. Une boule de silicone est positionnée à l'autre extrémité du cathéter à 3,6 cm de l'orifice, délimitant la portion introduite dans la veine jugulaire (Figure 32).

Figure 32 : Cathéter intraveineux

Une fois le montage implanté, la sortie métallique et le pas de vis (flèche blanche) seront les seuls éléments qui apparaîtront sur le dos du rat.

La boule de silicone (flèche rouge) délimite la longueur de cathéter implantée dans la veine jugulaire.



B-2 Implantation du cathéter intraveineux

Pour l'implantation du cathéter intraveineux, nous avons adapté une technique précédemment décrite (Caine *et al.*, 1993). Les rats ont été anesthésiés, puis deux incisions ont été effectuées : l'une au niveau du dos afin de dégager un espace sous-cutané permettant le bon positionnement de la maille de mersilène® et du pas de vis du cathéter, l'autre au niveau du cou afin de mettre à jour la veine jugulaire droite du rat. Le montage a alors été introduit par l'ouverture dorsale et le pas de vis a été externalisé au milieu du dos, postérieurement aux omoplates du rat. L'extrémité libre du montage a été amenée au niveau de l'incision du cou grâce à un espace sous-cutané allant de la clavicule droite à la nuque du rat. Une petite incision a été pratiquée dans la veine jugulaire et le cathéter a été introduit sur une distance de 3,6 cm, puis il a été fixé à la veine avec du fil de soie 5-0 (Ethicon) noué de part et d'autre de la boule de silicone du montage. L'animal a ensuite été suturé au niveau du dos et du cou avec du fil de soie 3-0 (Ethicon).

Les soins postopératoires ont consisté, d'une part, en l'injection sous-cutanée de carprofène, un anti-inflammatoire non stéroïdien (Rimadyl® de Pfizer, Centravet), et d'autre part en un nettoyage des plaies avec de la Biseptine® (Bayer, Leverkusen, Allemagne) avant application d'une crème cicatrisante (Cicaplast® de La Roche-Posay, L'Oréal, Paris, France). La fluidité du cathéter a été vérifiée une fois par jour pendant toute la durée de récupération postopératoire par l'injection de 150 µl d'un mélange contenant 100 U/ml d'héparine (Heparine choay®, Sanofi-Aventis, Paris, France) et 50 mg/ml d'ampicilline (Unacim® 1g, Pfizer, NY, Etats-Unis), afin de prévenir la coagulation du sang dans le cathéter et l'apparition d'infections.

B-3 Appareillage d'auto-administration intraveineuse

Toutes les sessions d'AA ont eu lieu dans des chambres construites en plastique noir (30 x 30 x 30 cm) possédant un socle amovible pour faciliter le nettoyage entre chaque session et un couvercle ne laissant pas passer la lumière (Figure 33a). L'appareillage d'AA est isolé dans une pièce spécifique où les bruits sont atténués.

Une pompe (Imetronic, Pessac, France) commandée par ordinateur et portant une seringue de 10 ml injecte la cocaïne *via* une tubulure en Silastic (Plastics One). La partie externalisée du cathéter intraveineux du rat est reliée à la tubulure par une canule tournante à une voie (Instech Laboratories, PA, Etats-Unis) fixée à une potence située sur le dessus de chacune des chambres. Ce système permet à l'animal de rester libre de ses mouvements.

Chaque chambre est équipée de deux orifices de 3 cm de diamètre situés sur une même paroi de la chambre, à 4 cm au-dessus du socle (Figure 33a). Le comportement à la base de notre protocole d'auto-administration est l'entrée du museau du rat dans l'un des orifices, action nommée « nose-poke » (NP ; Figure 33b). Un NP induit la rupture d'un rayon infrarouge situé à l'intérieur des orifices, ce qui en permet l'enregistrement. L'un des orifices est appelé « orifice actif » car il est à l'origine de la délivrance de la drogue, l'autre est alors appelé « orifice inactif ». La position droite ou gauche de l'orifice actif est répartie de manière équilibrée au sein des différents groupes expérimentaux. Les NP dans les deux orifices sont enregistrés, mais les NP dans l'orifice inactif n'ont pas d'effet programmé alors que ceux dans l'orifice actif induisent l'injection de 54 µl de la solution de cocaïne sur une durée de 2 sec.

Un stimulus lumineux, situé 20 cm au-dessus de l'orifice actif, s'allume à l'injection de la drogue et participe à l'acquisition du comportement. Une lumière ambiante s'allume dans la chambre d'AA à la fin de l'injection et reste allumée pendant les 40 sec de la période réfractaire (Figure 33a), période pendant laquelle les NP dans l'orifice actif, bien que toujours enregistrés, ne déclenchent pas d'injection supplémentaire de drogue.

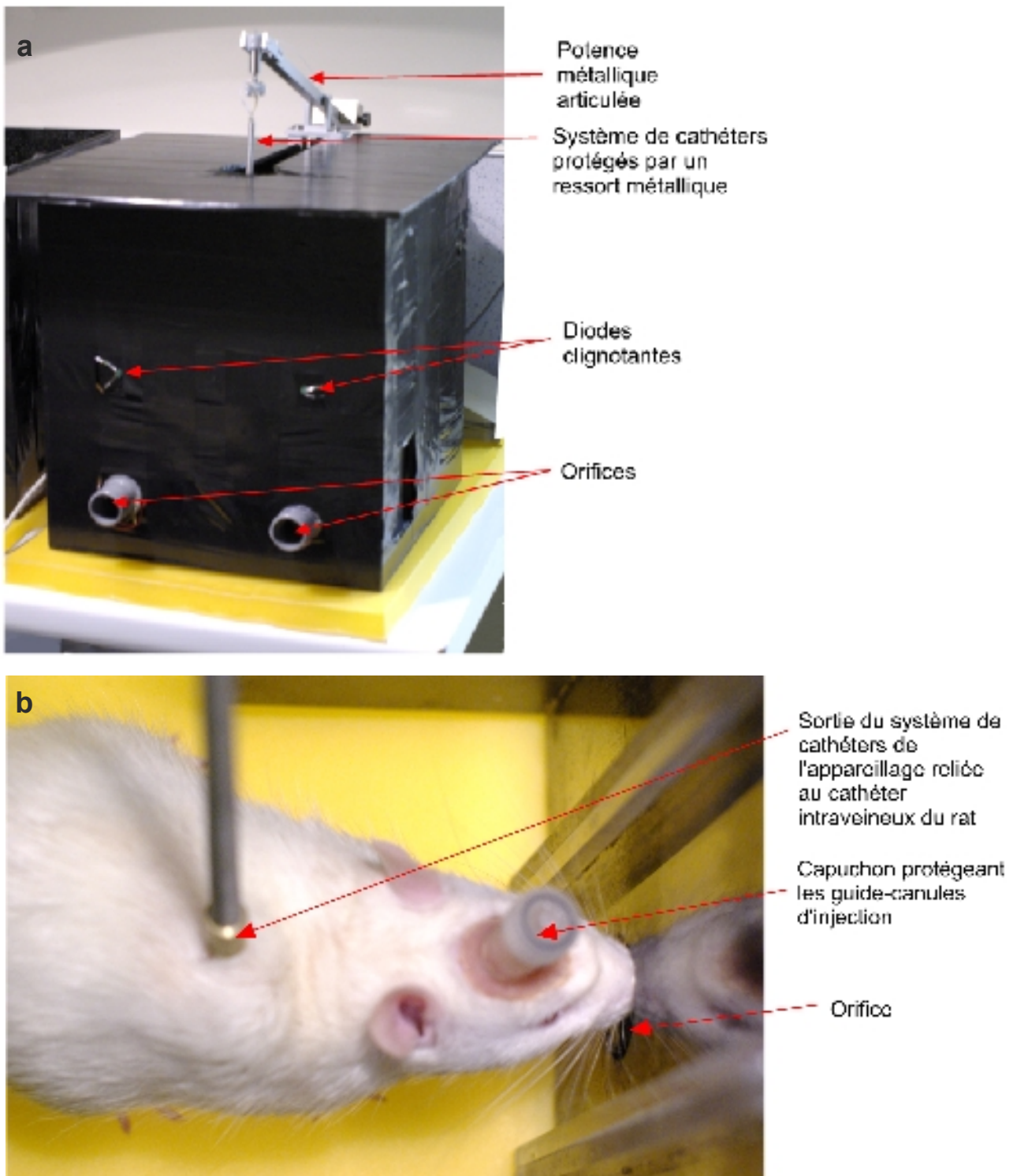


Figure 33 : Appareillage d'auto-administration intraveineuse

a) Chambre d'auto-administration

b) Rat effectuant un nose-poke

B-4 Protocoles d'auto-administration

Sauf mention contraire, les traitements intracérébraux ont été réalisés 15 min avant le début de chaque session d'AA. Les rats ont reçu par voie i.v. 150 µl de la solution d'héparine/ampicilline chaque jour avant d'être retournés à leur cage.

B-4-1 Ratio fixe

Les rats ont effectué des sessions de FR1 une fois par jour pendant sept jours consécutifs. Les sessions de FR1 ont duré 2 h (Figure 34). Dans le protocole de FR1, chaque NP dans l'orifice actif, en dehors de la période réfractaire de 40 sec, induit une injection i.v. de cocaïne. Aucune limite concernant le nombre d'injections que le rat est capable de déclencher pendant une session de 2 h n'a été instaurée. Notre dispositif expérimental n'a pas nécessité de protocole d'apprentissage du comportement pour les animaux, qui l'ont acquis en quelques sessions.

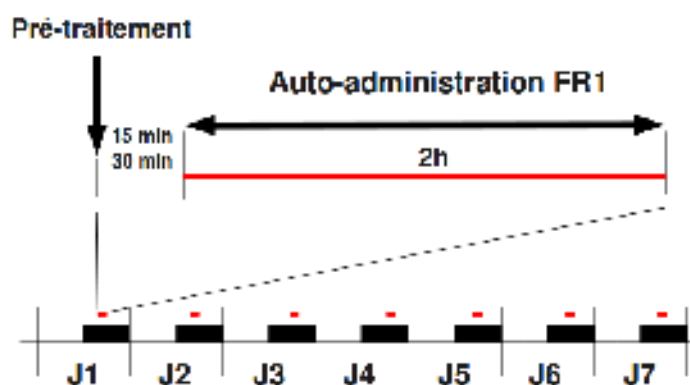


Figure 34 : Déroulement de l'auto-administration sous le protocole de FR1

Les barres blanches et noires représentent les périodes lumineuses et obscures, respectivement.

Les expériences de FR1 ont été réalisées principalement à une dose de cocaïne de 0,33 mg/kg/injection. Cette dose correspond au maximum de la courbe dose-réponse de la cocaïne dans nos conditions expérimentales, comme préalablement déterminé au laboratoire (Figure 35). Néanmoins, afin de mieux cerner les effets de nos traitements, une dose de cocaïne de 0,75 mg/kg/injection a également été utilisée.

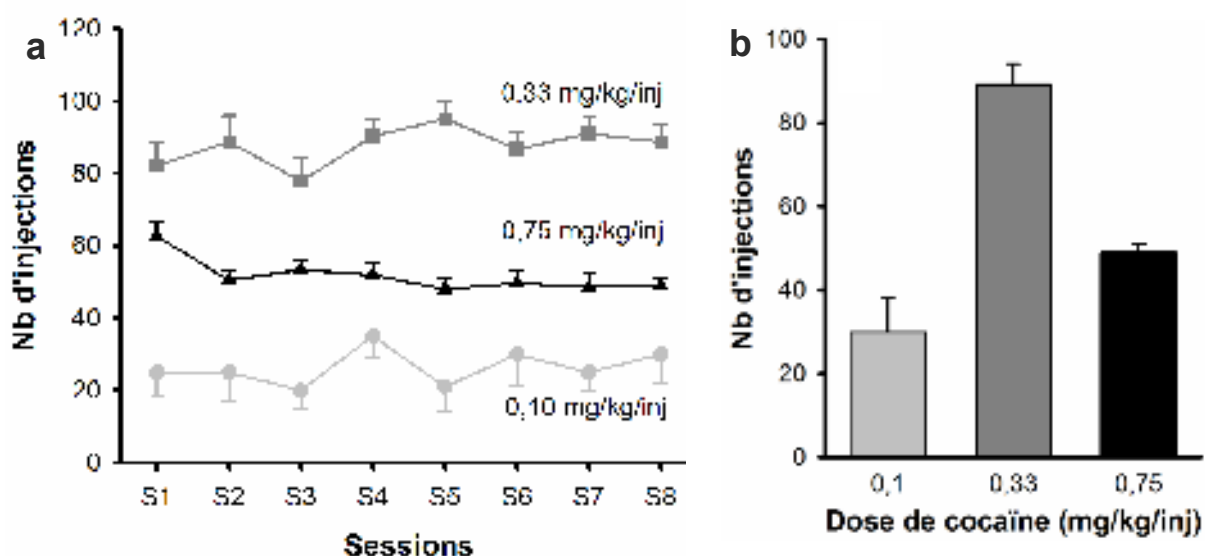


Figure 35 : Courbe dose-réponse de la cocaïne sous le protocole de FR1

Etude menée au laboratoire par Pascal Romieu et Lionel Host

Les rats ont été soumis à un protocole de FR1 sous plusieurs doses de cocaïne : 0,1, 0,33 et 0,75 mg/kg/injection.

a) Nombre moyen d'injections intraveineuses de cocaïne effectuées par les rats.

b) Relation dose-réponse à la huitième session.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm erreur-type ; $n = 8$ à 10 rats par groupe.

B-4-2 Ratio progressif

Les rats ont effectué des sessions de PR une fois par jour pendant sept jours consécutifs. Dans le protocole de PR, le nombre de NP requis pour obtenir une injection supplémentaire croît selon l'équation exponentielle suivante, où n représente le rang des injections successives (Richardson and Roberts, 1996 ; Figure 36b) : $NP(n) = [5 \cdot e^{0,2n}] - 5$.

Chaque session a duré au maximum 5 h, mais elle a été arrêtée si l'animal ne déclenchait pas d'injection supplémentaire de drogue pendant 1h. Afin que les rats acquièrent le comportement d'AA, ils ont d'abord été soumis à 3 ou 4 jours de FR1, sans traitement intracérébral, pendant lesquels les rats qui ne présentaient pas de comportement standard ont été retirés de l'expérience. Les injections intracérébrales ont commencé en même temps que les sessions de PR, qui ont eu lieu pendant sept jours consécutifs (Figure 36a).

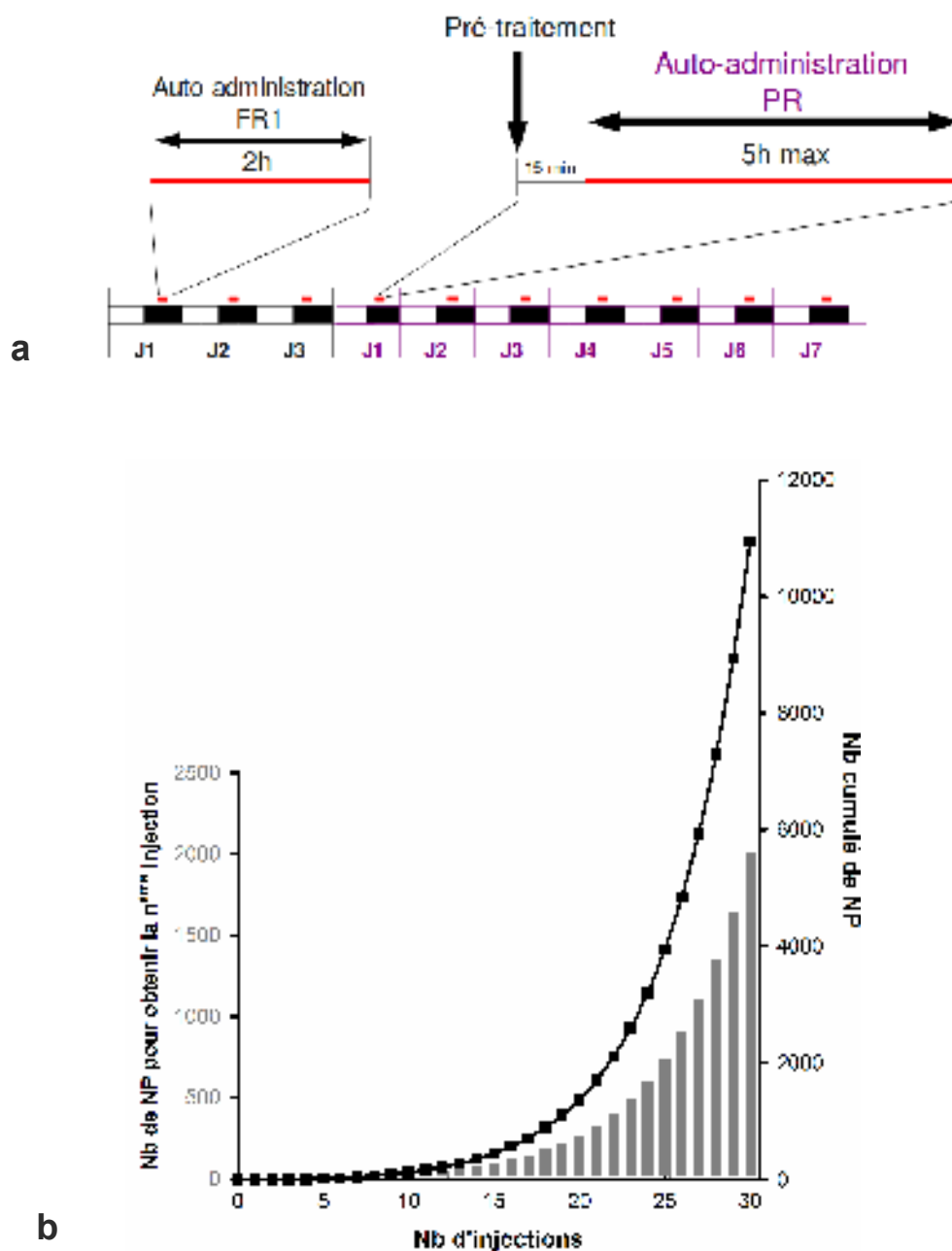


Figure 36 : Auto-administration sous un protocole de PR

a) Planning des traitements et de l'auto-administration. Les barres blanches et noires représentent les périodes lumineuses et obscures, respectivement.

b) Evolution du ratio [Nombre de nose-pokes nécessaires / injection] dans notre protocole de ratio progressif selon l'équation $NP(n) = [5 \cdot e^{0,2n}] - 5$ où n représente le rang des injections.

B-5 Analyse des données

Différentes données peuvent être extraites du comportement d'AA grâce à un programme développé dans notre laboratoire par Pascal Romieu sous le logiciel LabView (National Instruments), par l'intermédiaire d'une carte digitale (DIO-24, National Instruments, TX, Etats-Unis) ; le nombre d'injections déclenchées par les rats est enregistré à chaque session, ainsi que le nombre de NP effectués dans chacun des orifices. Ces données ont été exprimées dans les différentes analyses sous forme de moyennes \pm SEM et comparées par des ANOVA à deux facteurs pour mesures répétées (session et traitement comme facteurs ; tests post-hoc de Student-Newman-Keuls) sous le logiciel SigmaPlot (Systat software, Chicago, IL).

Pour les études immunohistochimiques les rats ont été sacrifiés 2h après la septième et dernière session d'AA (FR1 ; 0,33 mg/kg/injection) et leurs cerveaux fixés au paraformaldéhyde comme indiqué en C-1.

C - Études immunohistochimiques

C-1 Perfusions intracardiaques et coupes

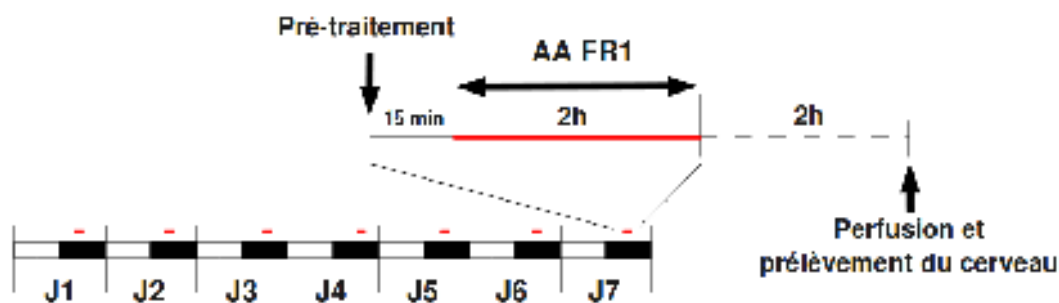


Figure 37 : Planning des perfusions intracardiaques à la fin des 7 jours d'auto-administration dans le protocole de FR1

Pour les études d'immunohistochimie les rats ont été anesthésiés avec du pentobarbital (100 mg/kg), puis injectés en intracardiaque avec 100 ml de NaCl 0,9 % à 4°C et fixés avec 250 ml de paraformaldéhyde 1 % à 4°C préparé dans du tampon phosphate 0,1 M (pH 7.5). Les cerveaux ont été prélevés et postfixés dans le même fixateur pendant 1 h à 4°C, puis cryoprotégés par immersion dans une solution de saccharose 15 % préparée dans du tampon phosphate 0,1 M (pH 7,54) à 4°C pendant 15 h. Ils ont enfin été congelés dans de l'isopentane refroidi à -40°C et stockés à -80°C. Des

coupes frontales d'une épaisseur de 20 μm ont été réalisées avec un cryostat Microm HM560 (Thermo Scientific) à -20°C puis montées sur des lames gélatinées et stockées à -80°C après 1 h de séchage à température ambiante. Les niveaux de coupe utilisés sont précisés en figure 35.

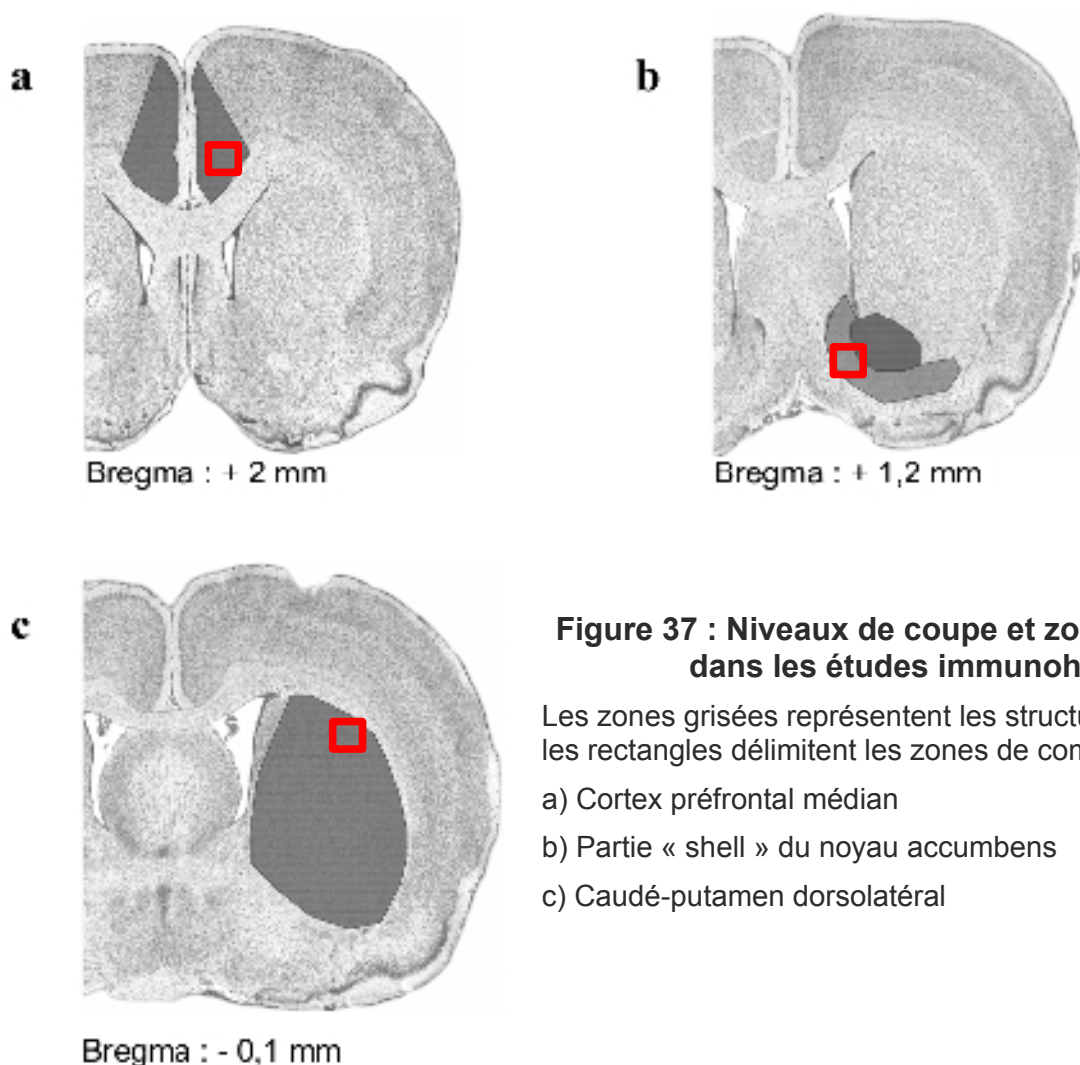


Figure 37 : Niveaux de coupe et zones analysées dans les études immunohistochimiques

Les zones grisées représentent les structures d'intérêt ; les rectangles délimitent les zones de comptage.

- a) Cortex préfrontal médian
- b) Partie « shell » du noyau accumbens
- c) Caudé-putamen dorsolatéral

Pour vérification du bon placement des guide-canules, des coupes supplémentaires ont été réalisées au niveau des sites d'implantation apparents et laissées à température ambiante pendant 14 jours avant coloration (Figure 30).

C-2 Protocole d'immunohistochimie

C-2-1 Anticorps

Les anticorps primaires utilisés sont listés dans le tableau 6.

| Type | Nom | Origine | Espèce | Dilution |
|-------|----------------------|------------|--------|----------|
| Ac I | Anti-AcH3 | Millipore | Lapin | 1:200 |
| | Anti-AcH4 | Millipore | Lapin | 1:1000 |
| | Anti-HDAC2 | Millipore | Lapin | 1:200 |
| | Anti-MeCP2 | Millipore | Lapin | 1:150 |
| | Anti-pMeCP2 (Ser 80) | Santa-Cruz | Lapin | 1:100 |
| | Anti-pH3 (Ser 10) | Millipore | Lapin | 1:200 |
| Ac II | Anti-lapin biotinylé | Vectastain | Cheval | 1:200 |

Ac I = Anticorps primaire ; Ac II = Anticorps secondaire ; AcH3 = Histone H3 acétylée ; AcH4 = Histone H4 acétylée ; HDAC2 = Désacétylase des histones 2 ; MeCP2 = Methyl-CpG -binding protein 2 ; pMeCP2 = forme phosphorylée de MeCP2, sur le résidu sérine 80 ; pH3 = forme phosphorylée de l'histone H3, sur le résidu sérine 10

C-2-2 Marquage et révélation à la peroxydase

Toutes les incubations ont été réalisées à température ambiante. Les coupes ont été délipidées dans de l'acétone pendant 3 à 5 min, puis séchées à l'air. Elles ont alors été rincées dans du PBS 1X, perméabilisées pendant 20 min dans une solution de triton 0,5 %, puis saturées pendant 20 min dans une solution d'albumine bovine (BSA) 0,5 %. Elles ont ensuite été placées une nuit en incubation en présence de l'anticorps primaire et de sérum de cheval ; des coupes, incubées uniquement avec l'anticorps secondaire biotinylé, ont constitué le marquage témoin.

Les coupes ont ensuite été rincées dans du PBS 1X, puis incubées pendant 45 min à l'obscurité avec un anticorps secondaire biotinylé. Après rinçage dans du PBS 1X, elles ont été incubées en présence du complexe peroxydase-avidine-biotine (Vectastain ABC Kit Elite, VectorLabs) pendant 1 h à l'obscurité puis à nouveau rincées avec du PBS 1X suivi d'un lavage dans une solution de TBS 1X.

La révélation de l'activité peroxydase a été faite par l'ajout pendant 5 à 10 min d'une solution contenant de la 3,3'-diaminobenzidine et de l'H₂O₂ (Peroxydase Substrate Kit, Vector, USA), qui fait apparaître un précipité brun. La réaction a été arrêtée par rinçage dans de l'eau déminéralisée. L'incubation dans 15 µM de bisbenzimidazole (Hoechst 33258, Sigma-Aldrich) pendant 15 min permet

de visualiser les noyaux cellulaires. Ce marquage nucléaire permet de compter la totalité des cellules et donc d'estimer le pourcentage de cellules immunoréactives. Les coupes ont finalement été rincées à l'eau déminéralisée et montées entre lame et lamelle dans une solution de Mowiol.

C-3 Analyse

Les lames ont été observées sous microscope binoculaire photonique (DM-RB Leitz binocular, Leica Microsystems, Wetzlar, Allemagne) équipé d'objectifs Fluotar 20X et 40X (Leica Microsystems). Des photos ont été prises avec une caméra Axiocam (Carl Zeiss, Iena, Allemagne). Deux images ont été prises pour chaque plan considéré : une photographie du marquage « DAB », en lumière transmise, qui renseigne sur l'aspect du marquage lié à l'anticorps primaire, et une photographie du marquage « Hoechst », en fluorescence, qui renseigne sur le nombre total de cellules présentes dans le plan .

La quantification du marquage a été réalisée grâce au logiciel ImageJ (NIH, MA) par un expérimentateur ignorant les conditions expérimentales dont sont issues les images. Autour de 600 cellules ont été comptées sur au moins 3 coupes par structure et par animal. Les résultats ont été exprimés en pourcentage de cellules marquées par rapport au nombre total de cellules dans le plan, et comparés par des ANOVA à un facteur (traitement comme facteur ; tests post-hoc de Student-Newman-Keuls), ou par des tests *t* de Student pour la comparaison de deux groupes expérimentaux, sous le logiciel SigmaPlot (Systat software, Chicago, IL).

Références bibliographiques

A

- Abusnina A, Alhosin M, Keravis T, Muller CD, Fuhrmann G, Bronner C, Lugnier C (2011a) Down-regulation of cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE1A is the key event of p73 and UHRF1 deregulation in thymoquinone-induced acute lymphoblastic leukemia cell apoptosis. *Cell Signal* 23:152–160.
- Abusnina A, Keravis T, Yougbaré I, Bronner C, Lugnier C (2011b) Anti-proliferative effect of curcumin on melanoma cells is mediated by PDE1A inhibition that regulates the epigenetic integrator UHRF1. *Mol Nutr Food Res* 55:1677–1689.
- Agulló L, Garcia-Dorado D, Escalona N, Ruiz-Meana M, Mirabet M, Inserte J, Soler-Soler J (2005) Membrane association of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase in cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 68:65–74.
- Akbarian S, Huang H-S (2009) Epigenetic regulation in human brain-focus on histone lysine methylation. *Biol Psychiatry* 65:198–203.
- Akey CW, Luger K (2003) Histone chaperones and nucleosome assembly. *Curr Opin Struct Biol* 13:6–14.
- Alarcón JM, Malleret G, Touzani K, Vronskaya S, Ishii S, Kandel ER, Barco A (2004) Chromatin acetylation, memory, and LTP are impaired in CBP[±] mice: a model for the cognitive deficit in Rubinstein-Taybi syndrome and its amelioration. *Neuron* 42:947–959.
- Alhaider AA, Lei SZ, Wilcox GL (1991) Spinal 5-HT₃ receptor-mediated antinociception: possible release of GABA. *J Neurosci* 11:1881–1888.
- Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE (1964) Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of rna synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 51:786–794.
- Allis CD, Berger SL, Cote J, Dent S, Jenuwien T, Kouzarides T, Pillus L, Reinberg D, Shi Y, Shiekhhattar R, Shilatifard A, Workman J, Zhang Y (2007) New nomenclature for chromatin-modifying enzymes. *Cell* 131:633–636.
- 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* 23:185–188.
- Anagnostaras SG, Robinson TE (1996) Sensitization to the psychomotor stimulant effects of amphetamine: modulation by associative learning. *Behav Neurosci* 110:1397–1414.
- Anand-Srivastava MB (2005) Natriuretic peptide receptor-C signaling and regulation. *Peptides* 26:1044–1059.
- Andén NE, Dahlström A, Fuxe K, Larsson K (1965) Mapping out of catecholamine and 5-hydroxytryptamine neurons innervating the telencephalon and diencephalon. *Life Sci* 4:1275–1279.
- Andrews KT, Haque A, Jones MK (2012) HDAC inhibitors in parasitic diseases. *Immunol Cell Biol* 90:66–77.
- Ardila A, Rosselli M, Strumwasser S (1991) Neuropsychological deficits in chronic cocaine abusers. *Int J Neurosci* 57:73–79.

B

- Balda MA, Anderson KL, Itzhak Y (2008) Differential role of the nNOS gene in the development of behavioral sensitization to cocaine in adolescent and adult B6;129S mice. *Psychopharmacology (Berl)* 200:509–519.
- Balda MA, Anderson KL, Itzhak Y (2009) The neuronal nitric oxide synthase (nNOS) gene contributes to the regulation of tyrosine hydroxylase (TH) by cocaine. *Neurosci Lett* 457:120–124.
- Banerjee A, Castro J, Sur M (2012) Rett syndrome: genes, synapses, circuits, and therapeutics. *Front Psychiatry* 3:34.
- Bannister AJ, Miska EA, Görlich D, Kouzarides T (2000) Acetylation of importin-alpha nuclear import factors by CBP/p300. *Curr Biol* 10:467–470.
- Barbeau A (1970) Dopamine and disease. *Can Med Assoc J* 103:824–832.

- Barnard EA, Skolnick P, Olsen RW, Mohler H, Sieghart W, Biggio G, Braestrup C, Bateson AN, Langer SZ (1998) International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev* 50:291–313.
- Barreto G, Schäfer A, Marhold J, Stach D, Swaminathan SK, Handa V, Döderlein G, Maltry N, Wu W, Lyko F, Niehrs C (2007) Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation. *Nature* 445:671–675.
- Bártová E, Krejčí J, Harnicarová A, Galiová G, Kozubek S (2008) Histone modifications and nuclear architecture: a review. *J Histochem Cytochem* 56:711–721.
- Batchelor M, Schenk JO (1998) Protein kinase A activity may kinetically upregulate the striatal transporter for dopamine. *J Neurosci* 18:10304–10309.
- Baxter G, Kennett G, Blaney F, Blackburn T (1995) 5-HT₂ receptor subtypes: a family re-united? *Trends Pharmacol Sci* 16:105–110.
- Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, Herman JG (2001) Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum Mol Genet* 10:687–692.
- Beavo JA (1995) Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev* 75:725–748.
- Bechara A, Damasio H, Damasio AR (2000) Emotion, decision making and the orbitofrontal cortex. *Cereb Cortex* 10:295–307.
- Bechara A, Van Der Linden M (2005) Decision-making and impulse control after frontal lobe injuries. *Curr Opin Neurol* 18:734–739.
- Belmont AS, Dietzel S, Nye AC, Strukov YG, Tumbar T (1999) Large-scale chromatin structure and function. *Curr Opin Cell Biol* 11:307–311.
- Berendse HW, Groenewegen HJ, Lohman AH (1992) Compartmental distribution of ventral striatal neurons projecting to the mesencephalon in the rat. *J Neurosci* 12:2079–2103.
- Berger SL (2002) Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev* 12:142–148.
- Berridge CW, Waterhouse BD (2003) The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res Brain Res Rev* 42:33–84.
- 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* 28:309–369.
- Best JA, Chen Y, Piech KM, Tank AW (1995) The response of the tyrosine hydroxylase gene to cyclic AMP is mediated by two cyclic AMP-response elements. *J Neurochem* 65:1934–1943.
- Bestor TH (2000) The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* 9:2395–2402.
- Beveridge TJR, Smith HR, Nader MA, Porrino LJ (2005) Effects of chronic cocaine self-administration on norepinephrine transporters in the nonhuman primate brain. *Psychopharmacology (Berl)* 180:781–788.
- Bhattacharya SK, Ramchandani S, Cervoni N, Szyf M (1999) A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. *Nature* 397:579–583.
- Bhutani N, Burns DM, Blau HM (2011) DNA demethylation dynamics. *Cell* 146:866–872.
- Bidzseranova A, Gueron J, Varga J, Telegdy G (1992) Effects of brain natriuretic peptide-32 on the extinction of active avoidance behavior in rats. Transmitter-mediated action. *Physiol Behav* 52:227–229.
- Bienvenu T, Chelly J (2006) Molecular genetics of Rett syndrome: when DNA methylation goes unrecognized. *Nat Rev Genet* 7:415–426.
- Biró G (1996) Cardiovascular risk factors distribution in Hungarian adults. *Acta Cardiol* 51:113–128.
- Blandina P, Goldfarb J, Green JP (1988) Activation of a 5-HT₃ receptor releases dopamine from rat striatal slice. *Eur J Pharmacol* 155:349–350.
- Blank TA, Becker PB (1995) Electrostatic mechanism of nucleosome spacing. *J Mol Biol* 252:305–313.
- Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31–39.

- Boerrigter G, Lapp H, Burnett JC (2009) Modulation of cGMP in heart failure: a new therapeutic paradigm. *Handb Exp Pharmacol*:485–506.
- Bonate PL, Swann A, Silverman PB (1997) Context-dependent cross-sensitization between cocaine and amphetamine. *Life Sci* 60:PL1–7.
- Bonese KF, Wainer BH, Fitch FW, Rothberg RM, Schuster CR (1974) Changes in heroin self-administration by a rhesus monkey after morphine immunisation. *Nature* 252:708–710.
- 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* 564:203–219.
- 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 USA* 91:12584–12588.
- Buffalari DM, Baldwin CK, See RE (2012) Treatment of cocaine withdrawal anxiety with guanfacine: relationships to cocaine intake and reinstatement of cocaine seeking in rats. *Psychopharmacology* (Berlin) [Epub ahead of print]
- Bunce CJ, Loudon PT, Akers C, Dobson J, Wood DM (2003) Development of vaccines to help treat drug dependence. *Curr Opin Mol Ther* 5:58–63.
- Bunzow JR, Van Tol HH, Grandy DK, Albert P, Salon J, Christie M, Machida CA, Neve KA, Civelli O (1988) Cloning and expression of a rat D2 dopamine receptor cDNA. *Nature* 336:783–787.
- Burette A, Zabel U, Weinberg RJ, Schmidt HH, Valtchanoff JG (2002) Synaptic localization of nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase in the hippocampus. *J Neurosci* 22:8961–8970.
- C**
- Cador M, Robbins TW, Everitt BJ (1989) Involvement of the amygdala in stimulus-reward associations: interaction with the ventral striatum. *Neuroscience* 30:77–86.
- Caine SB, Koob GF (1993) Modulation of cocaine self-administration in the rat through D-3 dopamine receptors. *Science* 260:1814–1816.
- Caine SB, Lintz R, Koob GF (1993) Intravenous drug self-administration techniques in animals. In: *Behavioural Neuroscience, A Practical Approach*, pp 117-143. Oxford, New York: IRL Press.
- 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.
- Carrera MR, Ashley JA, Wirsching P, Koob GF, Janda KD (2001) A second-generation vaccine protects against the psychoactive effects of cocaine. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:1988–1992.
- Carroll KM, Nich C, Ball SA, McCance E, Rounsaville BJ (1998) Treatment of cocaine and alcohol dependence with psychotherapy and disulfiram. *Addiction* 93:713–727.
- 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.
- Casteel DE, Zhuang S, Gudi T, Tang J, Vuica M, Desiderio S, Pilz RB (2002) cGMP-dependent protein kinase I beta physically and functionally interacts with the transcriptional regulator TFII-I. *J Biol Chem* 277:32003–32014.
- Castro LRV, Schittl J, Fischmeister R (2010) Feedback control through cGMP-dependent protein kinase contributes to differential regulation and compartmentation of cGMP in rat cardiac myocytes. *Circ Res* 107:1232–1240.
- Castro LRV, Verde I, Cooper DMF, Fischmeister R (2006) Cyclic guanosine monophosphate compartmentation in rat cardiac myocytes. *Circulation* 113:2221–2228.

- Cedar H (1988) DNA methylation and gene activity. *Cell* 53:3–4.
- Chahrour M, Zoghbi HY (2007) The story of Rett syndrome: from clinic to neurobiology. *Neuron* 56:422–437.
- Champagne FA, Weaver ICG, Diorio J, Dymov S, Szyf M, Meaney MJ (2006) Maternal care associated with methylation of the estrogen receptor- α promoter and estrogen receptor- α expression in the medial preoptic area of female offspring. *Endocrinology* 147:2909–2915.
- Chan SH, Chang K-F, Ou C-C, Chan JYH (2004) Nitric oxide regulates c-fos expression in nucleus tractus solitarius induced by baroreceptor activation via cGMP-dependent protein kinase and cAMP response element-binding protein phosphorylation. *Mol Pharmacol* 65:319–325.
- Chaperon F, Soubrié P, Puech AJ, Thiébot MH (1998) Involvement of central cannabinoid (CB1) receptors in the establishment of place conditioning in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 135:324–332.
- Chen HH, Burnett JC Jr (1998) C-type natriuretic peptide: the endothelial component of the natriuretic peptide system. *J Cardiovasc Pharmacol* 32 Suppl 3:S22–28.
- Chinkers M, Garbers DL, Chang MS, Lowe DG, Chin HM, Goeddel DV, Schulz S (1989) A membrane form of guanylate cyclase is an atrial natriuretic peptide receptor. *Nature* 338:78–83.
- 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* 72:2397–2403.
- Chusho H, Tamura N, Ogawa Y, Yasoda A, Suda M, Miyazawa T, Nakamura K, Nakao K, Kurihara T, Komatsu Y, Itoh H, Tanaka K, Saito Y, Katsuki M, Nakao K (2001) Dwarfism and early death in mice lacking C-type natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:4016–4021.
- Cibelli JB, Campbell KH, Seidel GE, West MD, Lanza RP (2002) The health profile of cloned animals. *Nat Biotechnol* 20:13–14.
- Clarke EGC, (1986) Clarke's isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids and postmortem materials, 2th Edition, London: The Pharmaceutical Press.
- Cocores JA, Miller NS, Pottash AC, Gold MS (1988) Sexual dysfunction in abusers of cocaine and alcohol. *Am J Drug Alcohol Abuse* 14:169–173.
- Collins SL, Edwards MA, Kantak KM (2001) Effects of nitric oxide synthase inhibitors on the discriminative stimulus effects of cocaine in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 154:261–273.
- Collins SL, Kantak KM (2002) Neuronal nitric oxide synthase inhibition decreases cocaine self-administration behavior in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 159:361–369.
- Cook NJ, Hanke W, Kaupp UB (1987) Identification, purification, and functional reconstitution of the cyclic GMP-dependent channel from rod photoreceptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:585–589.
- Cooper DM, Bier-Laning CM, Halford MK, Ahljanian MK, Zahniser NR (1986) Dopamine, acting through D-2 receptors, inhibits rat striatal adenylate cyclase by a GTP-dependent process. *Mol Pharmacol* 29:113–119.
- Corbin JD, Blount MA, Weeks JL 2nd, Beasley A, Kuhn KP, Ho YSJ, Saidi LF, Hurley JH, Kotera J, Francis SH (2003) [3 H]sildenafil binding to phosphodiesterase-5 is specific, kinetically heterogeneous, and stimulated by cGMP. *Mol Pharmacol* 63:1364–1372.
- Cornish JL, Duffy P, Kalivas PW (1999) A role for nucleus accumbens glutamate transmission in the relapse to cocaine-seeking behavior. *Neuroscience* 93:1359–1367.
- Corrigall WA, Coen KM (1991) Opiate antagonists reduce cocaine but not nicotine self-administration. *Psychopharmacology (Berl)* 104:167–170.
- Costall B, Naylor RJ (1993) The pharmacology of the 5-HT $_4$ receptor. *Int Clin Psychopharmacol* 8 Suppl 2:11–18.
- Crits-Christoph P et al. (1999) Psychosocial treatments for cocaine dependence: National Institute on Drug Abuse Collaborative Cocaine Treatment Study. *Arch Gen Psychiatry* 56:493–502.

- Cummings JL (1993) Frontal-subcortical circuits and human behavior. *Arch Neurol* 50:873–880.
- Cunningham ST, Finn M, Kelley AE (1997) Sensitization of the locomotor response to psychostimulants after repeated opiate exposure: role of the nucleus accumbens. *Neuropsychopharmacology* 16:147–155.
- D**
- Damsa C, Kosel M, Moussally J (2009) Current status of brain imaging in anxiety disorders. *Curr Opin Psychiatry* 22:96–110.
- Daniels LB, Maisel AS (2006) Natriuretic peptides as diagnostic test: lessons from the first 5 years of clinical application. *Heart Fail Clin* 2:299–309.
- Davidson RJ, Putnam KM, Larson CL (2000) Dysfunction in the neural circuitry of emotion regulation—a possible prelude to violence. *Science* 289:591–594.
- Dawson VL, Dawson TM, Bartley DA, Uhl GR, Snyder SH (1993) Mechanisms of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain cultures. *J Neurosci* 13:2651–2661.
- Deary 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* 347:72–76.
- Deaton AM, Bird A (2011) CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev* 25:1010–1022.
- Debinski W, Kuchel O, Buu NT, Cantin M, Genest J (1987) Atrial natriuretic factor partially inhibits the stimulated catecholamine synthesis in superior cervical ganglia of the rat. *Neurosci Lett* 77:92–96.
- de Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, Sonnenberg H (1981) A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci* 28:89–94.
- Decker JM, Wójtowicz AM, Ul Haq R, Braunewell K-H, Heinemann U, Behrens CJ (2009) C-type natriuretic peptide decreases hippocampal network oscillations in adult rats in vitro. *Neuroscience* 164:1764–1775.
- Decrouy A, Juteau M, Rousseau E (1995) Examination of the role of phosphorylation and phospholamban in the regulation of the cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} channel. *J Membr Biol* 146:315–326.
- de Frutos S, Saura M, Rivero-Vilches FJ, Rodriguez-Puyol D, Rodriguez-Puyol M (2003) C-type natriuretic peptide decreases soluble guanylate cyclase levels by activating the proteasome pathway. *Biochim Biophys Acta* 1643:105–112.
- de Lima MS, de Oliveira Soares BG, Reisser AAP, Farrell M (2002) Pharmacological treatment of cocaine dependence: a systematic review. *Addiction* 97:931–949.
- Dell’Acqua ML, Scott JD (1997) Protein kinase A anchoring. *J Biol Chem* 272:12881–12884.
- Demuth DG, Molleman A (2006) Cannabinoid signalling. *Life Sci* 78:549–563.
- Denslow SA, Wade PA (2007) The human Mi-2/NuRD complex and gene regulation. *Oncogene* 26:5433–5438.
- Derkach V, Surprenant A, North RA (1989) 5-HT₃ receptors are membrane ion channels. *Nature* 339:706–709.
- Deroche-Gamonet V, Belin D, Piazza PV (2004) Evidence for addiction-like behavior in the rat. *Science* 305:1014–1017.
- de Ruijter AJM, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg ABP (2003) Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* 370:737–749.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258:1946–1949.

- 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 USA* 85:5274–5278.
- Dickerson TJ, Janda KD (2005) Recent advances for the treatment of cocaine abuse: central nervous system immunopharmacotherapy. *AAPS J* 7:E579–586.
- Dietrich J-B, Takemori H, Grosch-Dirrig S, Bertorello A, Zwiller J (2012) Cocaine induces the expression of MEF2C transcription factor in rat striatum through activation of SIK1 and phosphorylation of the histone deacetylase HDAC5. *Synapse* 66:61–70.
- Dworkin SI, Stairs DJ (2003) Self-administration of drugs of abuse. In: *Methods in drug abuse research: cellular and circuit level analyses*, pp16-51. CRC Press LLC Edition.

E

- el-Husseini AE, Bladen C, Vincent SR (1995) Molecular characterization of a type II cyclic GMP-dependent protein kinase expressed in the rat brain. *J Neurochem* 64:2814–2817.
- Esteve L, Lutz P, Thiriet N, Revel M, Aunis D, Zwiller J (2001) Cyclic GMP-dependent protein kinase potentiates serotonin-induced Egr-1 binding activity in PC12 cells. *Cell Signal* 13:425–432.
- Everitt BJ, Robbins TW (2005) Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nat Neurosci* 8:1481–1489.

F

- Faleiro LJ, Jones S, Kauer JA (2004) Rapid synaptic plasticity of glutamatergic synapses on dopamine neurons in the ventral tegmental area in response to acute amphetamine injection. *Neuropsychopharmacology* 29:2115–2125.
- Feil S, Zimmermann P, Knorn A, Brummer S, Schlossmann J, Hofmann F, Feil R (2005) Distribution of cGMP-dependent protein kinase type I and its isoforms in the mouse brain and retina. *Neuroscience* 135:863–868.
- Fienberg AA et al. (1998) DARPP-32: regulator of the efficacy of dopaminergic neurotransmission. *Science* 281:838–842.
- Filip M, Bader M (2009) Overview on 5-HT receptors and their role in physiology and pathology of the central nervous system. *Pharmacol Rep* 61:761–777.
- Filip M, Przegaliński E (1998) The role of the nitric oxide (NO) pathway in the discriminative stimuli of amphetamine and cocaine. *Pharmacol Biochem Behav* 59:703–708.
- Fleming JA, Byck R, Barash PG (1990) Pharmacology and therapeutic applications of cocaine. *Anesthesiology* 73:518–531.
- Floresco SB, McLaughlin RJ, Haluk DM (2008) Opposing roles for the nucleus accumbens core and shell in cue-induced reinstatement of food-seeking behavior. *Neuroscience* 154:877–884.
- Florin SM, Kuczenski R, Segal DS (1994) Regional extracellular norepinephrine responses to amphetamine and cocaine and effects of clonidine pretreatment. *Brain Res* 654:53–62.
- Foote SL, Bloom FE, Aston-Jones G (1983) Nucleus locus ceruleus: new evidence of anatomical and physiological specificity. *Physiol Rev* 63:844–914.
- Forte LR, Thorne PK, Eber SL, Krause WJ, Freeman RH, Francis SH, Corbin JD (1992) Stimulation of intestinal Cl⁻ transport by heat-stable enterotoxin: activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP. *Am J Physiol* 263:C607–615.

- Foster JD, Cervinski MA, Gorentla BK, Vaughan RA (2006) Regulation of the dopamine transporter by phosphorylation. *Handb Exp Pharmacol*:197–214.
- Fox BS (1997) Development of a therapeutic vaccine for the treatment of cocaine addiction. *Drug Alcohol Depend* 48:153–158.
- Fraga MF et al. (2005) Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:10604–10609.
- Franceschini P, Martino S, Ciochini M, Ciuti E, Vardeu MP, Guala A, Signorile F, Camerano P, Franceschini D, Tovo PA (1995) Variability of clinical and immunological phenotype in immunodeficiency-centromeric instability-facial anomalies syndrome. Report of two new patients and review of the literature. *Eur J Pediatr* 154:840–846.
- Francis SH, Noblett BD, Todd BW, Wells JN, Corbin JD (1988) Relaxation of vascular and tracheal smooth muscle by cyclic nucleotide analogs that preferentially activate purified cGMP-dependent protein kinase. *Mol Pharmacol* 34:506–517.
- Francis SH, Turko IV, Corbin JD (2001) Cyclic nucleotide phosphodiesterases: relating structure and function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 65:1–52.
- Frankland PW, Bontempi B (2005) The organization of recent and remote memories. *Nat Rev Neurosci* 6:119–130.
- Franklin SG, Zweidler A (1977) Non-allelic variants of histones 2a, 2b and 3 in mammals. *Nature* 266:273–275.
- Freeman WM, Patel KM, Brucklacher RM, Lull ME, Erwin M, Morgan D, Roberts DCS, Vrana KE (2008) Persistent alterations in mesolimbic gene expression with abstinence from cocaine self-administration. *Neuropsychopharmacology* 33:1807–1817.
- Fremeau RT Jr, Duncan GE, Fornaretto MG, Derray A, Gingrich JA, Breese GR, Caron MG (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 USA* 88:3772–3776.
- Fujita N, Shimotake N, Ohki I, Chiba T, Saya H, Shirakawa M, Nakao M (2000) Mechanism of transcriptional regulation by methyl-CpG binding protein MBD1. *Mol Cell Biol* 20:5107–5118.
- Fuks F, Burgers WA, Godin N, Kasai M, Kouzarides T (2001) Dnmt3a binds deacetylases and is recruited by a sequence-specific repressor to silence transcription. *EMBO J* 20:2536–2544.
- Furukawa K, Ohshima N, Tawada-Iwata Y, Shigekawa M (1991) Cyclic GMP stimulates Na⁺/Ca²⁺ exchange in vascular smooth muscle cells in primary culture. *J Biol Chem* 266:12337–12341.
- Fuster JM (2001) The prefrontal cortex--an update: time is of the essence. *Neuron* 30:319–333.
- Gallo EF, Iadecola C (2011) Neuronal nitric oxide contributes to neuroplasticity-associated protein expression through cGMP, protein kinase G, and extracellular signal-regulated kinase. *J Neurosci* 31:6947–6955.
- Gao D, Narasimhan DL, Macdonald J, Brim R, Ko M-C, Landry DW, Woods JH, Sunahara RK, Zhan C-G (2009) Thermostable variants of cocaine esterase for long-time protection against cocaine toxicity. *Mol Pharmacol* 75:318–323.
- Garbers DL, Koesling D, Schultz G (1994) Guanylyl cyclase receptors. *Mol Biol Cell* 5:1–5.
- Gardiner-Garden M, Frommer M (1987) CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* 196:261–282.
- Gardner DG, Chen S, Glenn DJ, Grigsby CL (2007) Molecular biology of the natriuretic peptide system: implications for physiology and hypertension. *Hypertension* 49:419–426.
- Garthwaite J, Boulton CL (1995) Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol* 57:683–706.

G

- Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R (1988) Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 336:385–388.
- Geiselhöringer A, Gaisa M, Hofmann F, Schlossmann J (2004) Distribution of IRAG and cGKI-isoforms in murine tissues. *FEBS Lett* 575:19–22.
- Gibbs ME, Summers RJ (2002) Role of adrenoceptor subtypes in memory consolidation. *Prog Neurobiol* 67:345–391.
- Glozak MA, Sengupta N, Zhang X, Seto E (2005) Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene* 363:15–23.
- Gobert 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* 66:2209–2212.
- Goeders NE, McNulty MA, Mirkis S, McAllister KH (1989) Chlordiazepoxide alters intravenous cocaine self-administration in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 33:859–866.
- Goldenberg MM (1998) Safety and efficacy of sildenafil citrate in the treatment of male erectile dysfunction. *Clin Ther* 20:1033–1048.
- Goldstein A, Tachibana S, Lowney LI, Hunkapiller M, Hood L (1979) Dynorphin-(1-13), an extraordinarily potent opioid peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:6666–6670.
- Gremel CM, Cunningham CL (2008) Roles of the nucleus accumbens and amygdala in the acquisition and expression of ethanol-conditioned behavior in mice. *J Neurosci* 28:1076–1084.
- Haby C, Lisovoski F, Aunis D, Zwiller J (1994) Stimulation of the cyclic GMP pathway by NO induces expression of the immediate early genes c-fos and junB in PC12 cells. *J Neurochem* 62:496–501.
- Groenewegen HJ (1988) Organization of the afferent connections of the mediodorsal thalamic nucleus in the rat, related to the mediodorsal-prefrontal topography. *Neuroscience* 24:379–431.
- Grossman A, Clement-Jones V (1983) Opiate receptors: enkephalins and endorphins. *Clin Endocrinol Metab* 12:31–56.
- Grozinger CM, Schreiber SL (2000) Regulation of histone deacetylase 4 and 5 and transcriptional activity by 14-3-3-dependent cellular localization. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:7835–7840.
- 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* 599:51–56.
- Gudi T, Casteel DE, Vinson C, Boss GR, Pilz RB (2000) NO activation of fos promoter elements requires nuclear translocation of G-kinase I and CREB phosphorylation but is independent of MAP kinase activation. *Oncogene* 19:6324–6333.
- Gudi T, Lohmann SM, Pilz RB (1997) Regulation of gene expression by cyclic GMP-dependent protein kinase requires nuclear translocation of the kinase: identification of a nuclear localization signal. *Mol Cell Biol* 17:5244–5254.
- Guenther MG, Barak O, Lazar MA (2001) The SMRT and N-CoR corepressors are activating cofactors for histone deacetylase 3. *Mol Cell Biol* 21:6091–6101.
- Guevara-Guzman R, Emson PC, Kendrick KM (1994) Modulation of in vivo striatal transmitter release by nitric oxide and cyclic GMP. *J Neurochem* 62:807–810.
- Guix FX, Uribealago I, Coma M, Muñoz FJ (2005) The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Prog Neurobiol* 76:126–152.
- Hadah LM, Winchester JF (1990) Clinical management of poisoning and drug overdose, 2th Edition, Philadelphia: WB Saunders Company Inc.

H

- Haghikia A, Mergia E, Friebe A, Eysel UT, Koesling D, Mittmann T (2007) Long-term potentiation in the visual cortex requires both nitric oxide receptor guanylyl cyclases. *J Neurosci* 27:818–823.
- Haigis MC, Sinclair DA (2010) Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annu Rev Pathol* 5:253–295.
- Hake SB, Allis CD (2006) Histone H3 variants and their potential role in indexing mammalian genomes: the “H3 barcode hypothesis.” *Proc Natl Acad Sci USA* 103:6428–6435.
- Haley JE, Dickenson AH, Schachter M (1992) Electrophysiological evidence for a role of nitric oxide in prolonged chemical nociception in the rat. *Neuropharmacology* 31:251–258.
- Hall W, Gartner C (2011) Ethical and policy issues in using vaccines to treat and prevent cocaine and nicotine dependence. *Curr Opin Psychiatry* 24:191–196.
- Hansen JC, Nyborg JK, Luger K, Stargell LA (2010) Histone chaperones, histone acetylation, and the fluidity of the chromogenome. *J Cell Physiol* 224:289–299.
- Happel N, Doenecke D (2009) Histone H1 and its isoforms: contribution to chromatin structure and function. *Gene* 431:1–12.
- Hardman JG, Sutherland EW (1969) Guanyl cyclase, an enzyme catalyzing the formation of guanosine 3',5'-monophosphate from guanosine triphosphate. *J Biol Chem* 244:6363–6370.
- Hayes JS, Brunton LL, Mayer SE (1980) Selective activation of particulate cAMP-dependent protein kinase by isoproterenol and prostaglandin E1. *J Biol Chem* 255:5113–5119.
- Hayes RJ, Vorel SR, Spector J, Liu X, Gardner EL (2003) Electrical and chemical stimulation of the basolateral complex of the amygdala reinstates cocaine-seeking behavior in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 168:75–83.
- Heikaus CC, Pandit J, Klevit RE (2009) Cyclic nucleotide binding GAF domains from phosphodiesterases: structural and mechanistic insights. *Structure* 17:1551–1557.
- Hell JW, Westenbroek RE, Elliott EM, Catterall WA (1994) Differential phosphorylation, localization, and function of distinct alpha 1 subunits of neuronal calcium channels. Two size forms for class B, C, and D alpha 1 subunits with different COOH-termini. *Ann N Y Acad Sci* 747:282–293.
- Hendrich B, Bird A (2000) Mammalian methyltransferases and methyl-CpG-binding domains: proteins involved in DNA methylation. *Curr Top Microbiol Immunol* 249:55–74.
- Herman JP, Dolgas CM, Rucker D, Langub MC Jr (1996) Localization of natriuretic peptide-activated guanylate cyclase mRNAs in the rat brain. *J Comp Neurol* 369:165–187.
- Hermann A, Gowher H, Jeltsch A (2004) Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cell Mol Life Sci* 61:2571–2587.
- Hilário MRF, Costa RM (2008) High on habits. *Front Neurosci* 2:208–217.
- Hillemacher T, Frieling H, Hartl T, Wilhelm J, Kornhuber J, Bleich S (2009) Promoter specific methylation of the dopamine transporter gene is altered in alcohol dependence and associated with craving. *J Psychiatr Res* 43:388–392.
- Hodawadekar SC, Marmorstein R (2007) Chemistry of acetyl transfer by histone modifying enzymes: structure, mechanism and implications for effector design. *Oncogene* 26:5528–5540.
- Horiuchi A, Takeyasu K, Mouradian MM, Jose PA, Felder RA (1993) D1A dopamine receptor stimulation inhibits Na⁺/K⁺-ATPase activity through protein kinase A. *Mol Pharmacol* 43:281–285.
- Host L, Anglard P, Romieu P, Thibault C, Dembele D, Aunis D, Zwiller J (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* 113:236–247.
- Humblot N, Thiriet N, Gobaille S, Aunis D, Zwiller J (1998) The serotonergic system modulates the cocaine-induced expression of the immediate early genes *egr-1* and *c-fos* in rat brain. *Ann N Y Acad Sci* 844:7–20.
- Hunt WA, Redos JD, Dalton TK, Catravas GN (1977) Alterations in brain cyclic guanosine 3':5'-monophosphate levels after acute and chronic treatment with ethanol. *J Pharmacol Exp Ther* 201:103–109.

Hyman SE, Malenka RC, Nestler EJ (2006) Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annu Rev Neurosci* 29:565–598.

I

Ikemoto S (2007) Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex. *Brain Res Rev* 56:27–78.

Ikemoto S, Panksepp J (1999) The role of nucleus accumbens dopamine in motivated behavior: a unifying interpretation with special reference to reward-seeking. *Brain Res Brain Res Rev* 31:6–41.

Illi B, Colussi C, Grasselli A, Farsetti A, Capogrossi MC, Gaetano C (2009) NO sparks off chromatin: tales of a multifaceted epigenetic regulator. *Pharmacol Ther* 123:344–352.

Imai S, Armstrong CM, Kaeberlein M, Guarente L (2000) Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* 403:795–800.

Itzhak Y, Ali SF, Martin JL, Black MD, Huang PL (1998a) Resistance of neuronal nitric oxide synthase-deficient mice to cocaine-induced locomotor sensitization. *Psychopharmacology (Berl)* 140:378–386.

Itzhak Y, Martin JL, Black MD, Huang PL (1998b) The role of neuronal nitric oxide synthase in cocaine-induced conditioned place preference. *Neuroreport* 9:2485–2488.

Iwata T, Uchida-Mizuno K, Katafuchi T, Ito T, Hagiwara H, Hirose S (1991) Bifunctional atrial natriuretic peptide receptor (type A) exists as a disulfide-linked tetramer in plasma membranes of bovine adrenal cortex. *J Biochem* 110:35–39.

J

Jaber M, Robinson SW, Missale C, Caron MG (1996) Dopamine receptors and brain function. *Neuropharmacology* 35:1503–1519.

Jacobs BL, Azmitia EC (1992) Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev* 72:165–229.

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)* 146:373–390.

Jerison HJ (1994) Evolution of the brain. In: *Neuropsychology*, pp 53-81. San Diego: Academic Press Inc.

Jiang H, Colbran JL, Francis SH, Corbin JD (1992) Direct evidence for cross-activation of cGMP-dependent protein kinase by cAMP in pig coronary arteries. *J Biol Chem* 267:1015–1019.

Jin J, Cai Y, Li B, Conaway RC, Workman JL, Conaway JW, Kusch T (2005) In and out: histone variant exchange in chromatin. *Trends Biochem Sci* 30:680–687.

Johanson CE, Fischman MW (1989) The pharmacology of cocaine related to its abuse. *Pharmacol Rev* 41:3–52.

Joh TH, Park DH, Reis DJ (1978) Direct phosphorylation of brain tyrosine hydroxylase by cyclic AMP-dependent protein kinase: mechanism of enzyme activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:4744–4748.

Jones BJ, Blackburn TP (2002) The medical benefit of 5-HT research. *Pharmacol Biochem Behav* 71:555–568.

Jones PA, Laird PW (1999) Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 21:163–167.

- Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP (1998) Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 19:187–191.
- 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* 449:239–243.
- Jouvert P, Revel M-O, 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* 24:10716–10725.
- Jung BJ, Dawson R Jr, Sealey SA, Peris J (1999) Endogenous GABA release is reduced in the striatum of cocaine-sensitized rats. *Synapse* 34:103–110.
- Kadowaki K, Hirota K, Koike K, Ohmichi M, Miyake A, Tanizawa O (1992) Atrial and brain natriuretic peptides enhance dopamine accumulation in cultured rat hypothalamic cells including dopaminergic neurons. *Neuroendocrinology* 56:11–17.
- Kalivas PW, Duffy P (1995) D1 receptors modulate glutamate transmission in the ventral tegmental area. *J Neurosci* 15:5379–5388.
- 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* 245:485–492.
- Kalivas PW, Sorg BA, Hooks MS (1993) The pharmacology and neural circuitry of sensitization to psychostimulants. *Behav Pharmacol* 4:315–334.
- Kaludov NK, Wolffe AP (2000) MeCP2 driven transcriptional repression in vitro: selectivity for methylated DNA, action at a distance and contacts with the basal transcription machinery. *Nucleic Acids Res* 28:1921–1928.
- Kamisaki Y, Saheki S, Nakane M, Palmieri JA, Kuno T, Chang BY, Waldman SA, Murad F (1986) Soluble guanylate cyclase from rat lung exists as a heterodimer. *J Biol Chem* 261:7236–7241.
- Kampman KM, Dackis C, Lynch KG, Pettinati H, Tirado C, Gariti P, Sparkman T, Atzram M, O'Brien CP (2006) A double-blind, placebo-controlled trial of amantadine, propranolol, and their combination for the treatment of cocaine dependence in patients with severe cocaine withdrawal symptoms. *Drug Alcohol Depend* 85:129–137.
- Kampman KM, Volpicelli JR, Mulvaney F, Alterman AI, Cornish J, Gariti P, Cnaan A, Poole S, Muller E, Acosta T, Luce D, O'Brien C (2001a) Effectiveness of propranolol for cocaine dependence treatment may depend on cocaine withdrawal symptom severity. *Drug Alcohol Depend* 63:69–78.
- Kantak KM, Collins SL, Lipman EG, Bond J, Giovanoni K, Fox BS (2000) Evaluation of anti-cocaine antibodies and a cocaine vaccine in a rat self-administration model. *Psychopharmacology (Berl)* 148:251–262.
- Kaupp UB, Seifert R (2002) Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol Rev* 82:769–824.
- Kawata M, Nakao K, Morii N, Kiso Y, Yamashita H, Imura H, Sano Y (1985) Atrial natriuretic polypeptide: topographical distribution in the rat brain by radioimmunoassay and immunohistochemistry. *Neuroscience* 16:521–546.
- Kebabian JW, Beaulieu M, Itoh Y (1984) Pharmacological and biochemical evidence for the existence of two categories of dopamine receptor. *Can J Neurol Sci* 11:114–117.
- Kelley TJ, Al-Nakkash L, Drumm ML (1997) C-type natriuretic peptide increases chloride permeability in normal and cystic fibrosis airway cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 16:464–470.
- Kishimoto I, Dubois SK, Garbers DL (1996) The heart communicates with the kidney exclusively through the guanylyl cyclase-A receptor: acute handling of sodium and water in response to volume expansion. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:6215–6219.

K

- Kishimoto I, Tokudome T, Horio T, Soeki T, Chusho H, Nakao K, Kangawa K (2008) C-type natriuretic peptide is a Schwann cell-derived factor for development and function of sensory neurones. *J Neuroendocrinol* 20:1213–1223.
- 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 USA* 89:7782–7785.
- Knowles JW, Esposito G, Mao L, Hagaman JR, Fox JE, Smithies O, Rockman HA, Maeda N (2001) Pressure-independent enhancement of cardiac hypertrophy in natriuretic peptide receptor A-deficient mice. *J Clin Invest* 107:975–984.
- Koh GY, Nussenzveig DR, Okolicany J, Price DA, Maack T (1992) Dynamics of atrial natriuretic factor-guanylate cyclase receptors and receptor-ligand complexes in cultured glomerular mesangial and renomedullary interstitial cells. *J Biol Chem* 267:11987–11994.
- Komalavilas P, Lincoln TM (1994) Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 269:8701–8707.
- Koob GF (2008) A role for brain stress systems in addiction. *Neuron* 59:11–34.
- Koob GF, Bloom FE (1988) Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. *Science* 242:715–723.
- Koob GF, Le Moal M (1997) Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science* 278:52–58.
- Koob GF, Volkow ND (2010) Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology* 35:217–238.
- Korzus E, Rosenfeld MG, Mayford M (2004) CBP histone acetyltransferase activity is a critical component of memory consolidation. *Neuron* 42:961–972.
- Koshland D, Strunnikov A (1996) Mitotic chromosome condensation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:305–333.
- Kouzarides T (2000) Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *EMBO J* 19:1176–1179.
- Kouzarides T (2002) Histone methylation in transcriptional control. *Curr Opin Genet Dev* 12:198–209.
- Kouzarides T (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* 128:693–705.
- 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* 277:209–214.
- Kumar A, Choi K-H, Renthall W, Tsankova NM, Theobald DEH, Truong H-T, Russo SJ, Laplant Q, Sasaki TS, Whistler KN, Neve RL, Self DW, Nestler EJ (2005) Chromatin remodeling is a key mechanism underlying cocaine-induced plasticity in striatum. *Neuron* 48:303–314.
- Kuno T, Andresen JW, Kamisaki Y, Waldman SA, Chang LY, Saheki S, Leitman DC, Nakane M, Murad F (1986) Co-purification of an atrial natriuretic factor receptor and particulate guanylate cyclase from rat lung. *J Biol Chem* 261:5817–5823.
- L**
- Labrie V, Pai S, Petronis A (2012) Epigenetics of major psychosis: progress, problems and perspectives. *Trends Genet* 28: 427-435.
- Landgraf W, Hullin R, Göbel C, Hofmann F (1986) Phosphorylation of cGMP-dependent protein kinase increases the affinity for cyclic AMP. *Eur J Biochem* 154:113–117.
- Lan F, Nottke AC, Shi Y (2008) Mechanisms involved in the regulation of histone lysine demethylases. *Curr Opin Cell Biol* 20:316–325.
- Langub MC Jr, Watson RE Jr, Herman JP (1995) Distribution of natriuretic peptide precursor mRNAs in the rat brain. *J Comp Neurol* 356:183–199.

- LaPlant Q et al. (2010) Dnmt3a regulates emotional behavior and spine plasticity in the nucleus accumbens. *Nat Neurosci* 13:1137–1143.
- LeDoux JE (1993) Emotional memory: in search of systems and synapses. *Ann N Y Acad Sci* 702:149–157.
- Lee BR, Dong Y (2011) Cocaine-induced metaplasticity in the nucleus accumbens: silent synapse and beyond. *Neuropharmacology* 61:1060–1069.
- Lee CYW, Lieu H, Burnett JC Jr (2009) Designer natriuretic peptides. *J Investig Med* 57:18–21.
- Lee DK, Ahn SM, Shim Y-B, Koh WCA, Shim I, Choe ES (2011) Interactions of Dopamine D1 and N-methyl-D-Aspartate Receptors are Required for Acute Cocaine-Evoked Nitric Oxide Efflux in the Dorsal Striatum. *Exp Neurobiol* 20:116–122.
- LeSage MG, Stafford D, Glowa JR (1999) Preclinical research on cocaine self-administration: environmental determinants and their interaction with pharmacological treatment. *Neurosci Biobehav Rev* 23:717–741.
- Levenson JM, O’Riordan KJ, Brown KD, Trinh MA, Molfese DL, Sweatt JD (2004) Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *J Biol Chem* 279:40545–40559.
- Levine AA, Guan Z, Barco A, Xu S, Kandel ER, Schwartz JH (2005) CREB-binding protein controls response to cocaine by acetylating histones at the fosB promoter in the mouse striatum. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:19186–19191.
- Lewis JD, Meehan RR, Henzel WJ, Maurer-Fogy I, Jeppesen P, Klein F, Bird A (1992) Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell* 69:905–914.
- Liang D-Y, Clark JD (2004) Modulation of the NO/CO-cGMP signaling cascade during chronic morphine exposure in mice. *Neurosci Lett* 365:73–77.
- Li F, Papworth M, Minczuk M, Rohde C, Zhang Y, Ragozin S, Jeltsch A (2007) Chimeric DNA methyltransferases target DNA methylation to specific DNA sequences and repress expression of target genes. *Nucleic Acids Res* 35:100–112.
- 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* 118:451–462.
- Li J-X, Han R, Deng Y-P, Chen S-Q, Liang J-H (2005) Different effects of valproate on methamphetamine- and cocaine-induced behavioral sensitization in mice. *Behav Brain Res* 161:125–132.
- Lin CW, Miller TR, Witte DG, Bianchi BR, Stashko M, Manelli AM, Frail DE (1995) Characterization of cloned human dopamine D1 receptor-mediated calcium release in 293 cells. *Mol Pharmacol* 47:131–139.
- Lindner HH (2008) Analysis of histones, histone variants, and their post-translationally modified forms. *Electrophoresis* 29:2516–2532.
- Linseman DA, Bartley CM, Le SS, Laessig TA, Bouchard RJ, Meintzer MK, Li M, Heidenreich KA (2003) Inactivation of the myocyte enhancer factor-2 repressor histone deacetylase-5 by endogenous Ca(2+) //calmodulin-dependent kinase II promotes depolarization-mediated cerebellar granule neuron survival. *J Biol Chem* 278:41472–41481.
- Liu Y, Edwards RH (1997) The role of vesicular transport proteins in synaptic transmission and neural degeneration. *Annu Rev Neurosci* 20:125–156.
- Lohmann SM, Vaandrager AB, Smolenski A, Walter U, De Jonge HR (1997) Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem Sci* 22:307–312.
- Lopez MJ, Garbers DL, Kuhn M (1997) The guanylyl cyclase-deficient mouse defines differential pathways of natriuretic peptide signaling. *J Biol Chem* 272:23064–23068.
- Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik KP, Waldman SA (2000) Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev* 52:375–414.
- Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389:251–260.
- Luger K, Richmond TJ (1998) The histone tails of the nucleosome. *Curr Opin Genet Dev* 8:140–146.

M

- Lugnier C (2006) Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacol Ther* 109:366–398.
- Macmillan M (2000) Restoring Phineas Gage: a 150th retrospective. *J Hist Neurosci* 9:46–66.
- 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* 535:221–226.
- Ma J, Yu W, Wang Y, Cao G, Cai S, Chen X, Yan N, Yuan Y, Zeng H, Fleenor DL, Liu X, Pang I-H (2010) Neuroprotective effects of C-type natriuretic peptide on rat retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:3544–3553.
- Maldonado R, Valverde O, Berrendero F (2006) Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction. *Trends Neurosci* 29:225–232.
- Malgaroli A, Vallar L, Elahi FR, Pozzan T, Spada A, Meldolesi J (1987) Dopamine inhibits cytosolic Ca²⁺ increases in rat lactotroph cells. Evidence of a dual mechanism of action. *J Biol Chem* 262:13920–13927.
- Manzanedo C, Aguilar MA, Do Couto BR, Rodríguez-Arias M, Miñarro J (2009) Involvement of nitric oxide synthesis in sensitization to the rewarding effects of morphine. *Neurosci Lett* 464:67–70.
- Marte A, Pepicelli O, Cavallero A, Raiteri M, Fedele E (2008) In vivo effects of phosphodiesterase inhibition on basal cyclic guanosine monophosphate levels in the prefrontal cortex, hippocampus and cerebellum of freely moving rats. *J Neurosci Res* 86:3338–3347.
- Martell BA, Mitchell E, Poling J, Gonsai K, Kosten TR (2005) Vaccine pharmacotherapy for the treatment of cocaine dependence. *Biol Psychiatry* 58:158–164.
- Martell BA, Orson FM, Poling J, Mitchell E, Rossen RD, Gardner T, Kosten TR (2009) Cocaine vaccine for the treatment of cocaine dependence in methadone-maintained patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled efficacy trial. *Arch Gen Psychiatry* 66:1116–1123.
- Martínez I, Paredes RG (2001) Only self-paced mating is rewarding in rats of both sexes. *Horm Behav* 40:510–517.
- Martin KF, Hannon S, Phillips I, Heal DJ (1992) Opposing roles for 5-HT_{1B} and 5-HT₃ receptors in the control of 5-HT release in rat hippocampus in vivo. *Br J Pharmacol* 106:139–142.
- Marutha Ravindran CR, Ticku MK (2004) Changes in methylation pattern of NMDA receptor NR2B gene in cortical neurons after chronic ethanol treatment in mice. *Brain Res Mol Brain Res* 121:19–27.
- Masumi A (2011) Histone acetyltransferases as regulators of nonhistone proteins: the role of interferon regulatory factor acetylation on gene transcription. *J Biomed Biotechnol* 2011:640610.
- Matsuoka I, Giuili G, Poyard M, Stengel D, Parma J, Guellaen G, Hanoune J (1992) Localization of adenylyl and guanylyl cyclase in rat brain by in situ hybridization: comparison with calmodulin mRNA distribution. *J Neurosci* 12:3350–3360.
- Ma X, Ezzeldin HH, Diasio RB (2009) Histone deacetylase inhibitors: current status and overview of recent clinical trials. *Drugs* 69:1911–1934.
- Maze I, Covington HE 3rd, Dietz DM, LaPlant Q, Renthal W, Russo SJ, Mechanic M, Mouzon E, Neve RL, Haggarty SJ, Ren Y, Sampath SC, Hurd YL, Greengard P, Tarakhovskiy A, Schaefer A, Nestler EJ (2010) Essential role of the histone methyltransferase G9a in cocaine-induced plasticity. *Science* 327:213–216.
- McCance EF, Price LH, Kosten TR, Jatlow PI (1995) Cocaethylene: pharmacology, physiology and behavioral effects in humans. *J Pharmacol Exp Ther* 274:215–223.

- McDougle CJ, Black JE, Malison RT, Zimmermann RC, Kosten TR, Heninger GR, Price LH (1994) Noradrenergic dysregulation during discontinuation of cocaine use in addicts. *Arch Gen Psychiatry* 51:713–719.
- McGhee JD, Felsenfeld G (1980) Nucleosome structure. *Annu Rev Biochem* 49:1115–1156.
- McGowan PO, Sasaki A, D'Alessio AC, Dymov S, Labonté B, Szyf M, Turecki G, Meaney MJ (2009) Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nat Neurosci* 12:342–348.
- McKinsey TA (2012) Therapeutic potential for HDAC inhibitors in the heart. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 52:303–319.
- McKinsey TA, Zhang CL, Lu J, Olson EN (2000) Signal-dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation. *Nature* 408:106–111.
- Mello NK, Mendelson JH, Bree MP, Lukas SE (1989) Buprenorphine suppresses cocaine self-administration by rhesus monkeys. *Science* 245:859–862.
- Mendelson JH, Mello NK (1996) Management of cocaine abuse and dependence. *N Engl J Med* 334:965–972.
- Meredith GE (1999) The synaptic framework for chemical signaling in nucleus accumbens. *Ann N Y Acad Sci* 877:140–156.
- Mergia E, Koesling D, Friebe A (2009) Genetic mouse models of the NO receptor “soluble” guanylyl cyclases. *Handb Exp Pharmacol*:33–46.
- Meriney SD, Gray DB, Pilar GR (1994) Somatostatin-induced inhibition of neuronal Ca²⁺ current modulated by cGMP-dependent protein kinase. *Nature* 369:336–339.
- Mika D, Leroy J, Vandecasteele G, Fischmeister R (2012) [Role of cyclic nucleotide phosphodiesterases in the cAMP compartmentation in cardiac cells]. *Biol Aujourd'hui* 206:11–24.
- 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* 46:423–462.
- Miska EA, Karlsson C, Langley E, Nielsen SJ, Pines J, Kouzarides T (1999) HDAC4 deacetylase associates with and represses the MEF2 transcription factor. *EMBO J* 18:5099–5107.
- Mogenson GJ, Jones DL, Yim CY (1980) From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. *Prog Neurobiol* 14:69–97.
- Mukoyama M, Nakao K, Hosoda K, Suga S, Saito Y, Ogawa Y, Shirakami G, Jougasaki M, Obata K, Yasue H (1991) Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans. Evidence for an exquisite dual natriuretic peptide system, atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide. *J Clin Invest* 87:1402–1412.
- Müller D, Hida B, Guidone G, Speth RC, Michurina TV, Enikolopov G, Middendorff R (2009) Expression of guanylyl cyclase (GC)-A and GC-B during brain development: evidence for a role of GC-B in perinatal neurogenesis. *Endocrinology* 150:5520–5529.
- Nagase M, Katafuchi T, Hirose S, Fujita T (1997) Tissue distribution and localization of natriuretic peptide receptor subtypes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 15:1235–1243.
- Nakada S, Chen GI, Gingras A-C, Durocher D (2008) PP4 is a gamma H2AX phosphatase required for recovery from the DNA damage checkpoint. *EMBO Rep* 9:1019–1026.

N

- Nakanishi S, Nakajima Y, Masu M, Ueda Y, Nakahara K, Watanabe D, Yamaguchi S, Kawabata S, Okada M (1998) Glutamate receptors: brain function and signal transduction. *Brain Res Brain Res Rev* 26:230–235.
- Nan X, Campoy FJ, Bird A (1997) MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell* 88:471–481.
- Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A (1998) Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393:386–389.
- Nasif FJ, Hu X-T, Ramirez OA, Perez MF (2011) Inhibition of neuronal nitric oxide synthase prevents alterations in medial prefrontal cortex excitability induced by repeated cocaine administration. *Psychopharmacology (Berl)* 218:323–330.
- Nelson DL (2004) 5-HT₅ receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 3:53–58.
- Nestler EJ (2001) Molecular neurobiology of addiction. *Am J Addict* 10:201–217.
- Nielsen DA, Yuferov V, Hamon S, Jackson C, Ho A, Ott J, Kreek MJ (2009) Increased OPRM1 DNA methylation in lymphocytes of methadone-maintained former heroin addicts. *Neuropsychopharmacology* 34:867–873.
- Nowak SJ, Corces VG (2004) Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends Genet* 20:214–220.
- Nugent FS, Kauer JA (2008) LTP of GABAergic synapses in the ventral tegmental area and beyond. *J Physiol (Lond)* 586:1487–1493.
- Nussenzveig DR, Lewicki JA, Maack T (1990) Cellular mechanisms of the clearance function of type C receptors of atrial natriuretic factor. *J Biol Chem* 265:20952–20958.
- O'Brien CP, Childress AR, Ehrman R, Robbins SJ (1998) Conditioning factors in drug abuse: can they explain compulsion? *J Psychopharmacol (Oxford)* 12:15–22.
- O'Dell TJ, Hawkins RD, Kandel ER, Arancio O (1991) Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:11285–11289.
- Olds J, Milner P (1954) Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J Comp Physiol Psychol* 47:419–427.
- Olive MF, Koenig HN, Nannini MA, Hodge CW (2001) Stimulation of endorphin neurotransmission in the nucleus accumbens by ethanol, cocaine, and amphetamine. *J Neurosci* 21:RC184.
- Olsen RW (2002) GABA. In: *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*, pp 159–168. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Ornali P, Olanas MC (1989) Involvement of adenylate cyclase inhibition in dopamine autoreceptor regulation of tyrosine hydroxylase in rat nucleus accumbens. *Neurosci Lett* 102:91–96.
- ONU (1961) Convention unique sur les stupéfiants, New York. In: *Nations Unies, Recueil des Traités*, vol 250 p. 151; vol 557 p. 280; vol 570 p. 347
- Orrego F, Villanueva S (1993) The chemical nature of the main central excitatory transmitter: a critical appraisal based upon release studies and synaptic vesicle localization. *Neuroscience* 56:539–555.
- Orsini C, Izzo E, Koob GF, Pulvirenti L (2002) Blockade of nitric oxide synthesis reduces responding for cocaine self-administration during extinction and reinstatement. *Brain Res* 925:133–140.
- Oset-Gasque MJ, Parramón M, Hortelano S, Boscá L, González MP (1994) Nitric oxide implication in the control of neurosecretion by chromaffin cells. *J Neurochem* 63:1693–1700.

O

P

- Pandey SC, Ugale R, Zhang H, Tang L, Prakash A (2008) Brain chromatin remodeling: a novel mechanism of alcoholism. *J Neurosci* 28:3729–3737.
- Parpura V, Zorec R (2010) Gliotransmission: Exocytotic release from astrocytes. *Brain Res Rev* 63:83–92.
- Parsons LH, Koob GF, Weiss F (1996) Extracellular serotonin is decreased in the nucleus accumbens during withdrawal from cocaine self-administration. *Behav Brain Res* 73:225–228.
- Parsons LH, Smith AD, Justice JB Jr (1991) Basal extracellular dopamine is decreased in the rat nucleus accumbens during abstinence from chronic cocaine. *Synapse* 9:60–65.
- Parthun MR (2007) Hat1: the emerging cellular roles of a type B histone acetyltransferase. *Oncogene* 26:5319–5328.
- Pascual-Leone A, Dhuna A, Anderson DC (1991) Cerebral atrophy in habitual cocaine abusers: a planimetric CT study. *Neurology* 41:34–38.
- Paxinos G, Watson C (1997) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Compact 3rd Edition. San Diego: Academic Press.
- Perper JA, Van Thiel DH (1992) Respiratory complications of cocaine abuse. *Recent Dev Alcohol* 10:363–377.
- Perry JL, Carroll ME (2008) The role of impulsive behavior in drug abuse. *Psychopharmacology (Berl)* 200:1–26.
- Petronis A, Paterson AD, Kennedy JL (1999) Schizophrenia: an epigenetic puzzle? *Schizophr Bull* 25:639–655.
- Piggott LA, Hassell KA, Berkova Z, Morris AP, Silberbach M, Rich TC (2006) Natriuretic peptides and nitric oxide stimulate cGMP synthesis in different cellular compartments. *J Gen Physiol* 128:3–14.
- Pilz RB, Casteel DE (2003) Regulation of gene expression by cyclic GMP. *Circ Res* 93:1034–1046.
- Poling J, Kosten TR, Sofuoglu M (2007) Treatment outcome predictors for cocaine dependence. *Am J Drug Alcohol Abuse* 33:191–206.
- Porcu M, Chiarugi A (2005) The emerging therapeutic potential of sirtuin-interacting drugs: from cell death to lifespan extension. *Trends Pharmacol Sci* 26:94–103.
- Posner MI, Petersen SE (1990) The attention system of the human brain. *Annu Rev Neurosci* 13:25–42.
- Post RM (1975) Cocaine psychoses: a continuum model. *Am J Psychiatry* 132:225–231.
- Potter LR, Garbers DL (1994) Protein kinase C-dependent desensitization of the atrial natriuretic peptide receptor is mediated by dephosphorylation. *J Biol Chem* 269:14636–14642.
- Potter LR, Yoder AR, Flora DR, Antos LK, Dickey DM (2009) Natriuretic peptides: their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications. *Handb Exp Pharmacol*:341–366.
- Pryzwansky KB, Wyatt TA, Lincoln TM (1995) Cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase is targeted to intermediate filaments and phosphorylates vimentin in A23187-stimulated human neutrophils. *Blood* 85:222–230.
- Pudiak CM, Bozarth MA (2002) The effect of nitric oxide synthesis inhibition on intravenous cocaine self-administration. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 26:189–196.
- Pulvirenti L, Balducci C, Koob GF (1996) Inhibition of nitric oxide synthesis reduces intravenous cocaine self-administration in the rat. *Neuropharmacology* 35:1811–1814.

Q

Qin W, Leonhardt H, Pichler G (2011) Regulation of DNA methyltransferase 1 by interactions and modifications. *Nucleus* 2:392–402.

R

Reneerkens OAH, Rutten K, Steinbusch HWM, Blokland A, Prickaerts J (2009) Selective phosphodiesterase inhibitors: a promising target for cognition enhancement. *Psychopharmacology (Berl)* 202:419–443.

Renthal W, Kumar A, Xiao G, Wilkinson M, Covington HE 3rd, Maze I, Sikder D, Robison AJ, LaPlant Q, Dietz DM, Russo SJ, Vialou V, Chakravarty S, Kodadek TJ, Stack A, Kabbaj M, Nestler EJ (2009) Genome-wide analysis of chromatin regulation by cocaine reveals a role for sirtuins. *Neuron* 62:335–348.

Renthal W, Maze I, Krishnan V, Covington HE 3rd, Xiao G, Kumar A, Russo SJ, Graham A, Tsankova N, Kippin TE, Kerstetter KA, Neve RL, Haggarty SJ, McKinsey TA, Bassel-Duby R, Olson EN, Nestler EJ (2007) Histone deacetylase 5 epigenetically controls behavioral adaptations to chronic emotional stimuli. *Neuron* 56:517–529.

Renthal W, Nestler EJ (2009) Histone acetylation in drug addiction. *Semin Cell Dev Biol* 20:387–394.

Richardson NR, Roberts DC (1996) Progressive ratio schedules in drug self-administration studies in rats: a method to evaluate reinforcing efficacy. *J Neurosci Methods* 66:1–11.

Ritz MC, Cone EJ, Kuhar MJ (1990) Cocaine inhibition of ligand binding at dopamine, norepinephrine and serotonin transporters: a structure-activity study. *Life Sci* 46:635–645.

Robbins TW, Everitt BJ (1999) Drug addiction: bad habits add up. *Nature* 398:567–570.

Roberts DC, Andrews MM (1997) Baclofen suppression of cocaine self-administration: demonstration using a discrete trials procedure. *Psychopharmacology (Berl)* 131:271–277.

Roberts DC, Loh EA, Vickers G (1989) Self-administration of cocaine on a progressive ratio schedule in rats: dose-response relationship and effect of haloperidol pretreatment. *Psychopharmacology (Berl)* 97:535–538.

Robertson KD (2002) DNA methylation and chromatin - unraveling the tangled web. *Oncogene* 21:5361–5379.

Robinson TE, Berridge KC (1993) The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Brain Res Rev* 18:247–291.

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* 39:257–266.

Rogakou EP, Nieves-Neira W, Boon C, Pommier Y, Bonner WM (2000) Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *J Biol Chem* 275:9390–9395.

Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273:5858–5868.

Romieu P, Gobaille S, Aunis D, Zwiller J (2008a) Injection of the neuropeptide CNP into dopaminergic rat brain areas decreases alcohol intake. *Ann N Y Acad Sci* 1139:27–33.

Romieu P, Host L, Gobaille S, Sandner G, Aunis D, Zwiller J (2008b) Histone deacetylase inhibitors decrease cocaine but not sucrose self-administration in rats. *J Neurosci* 28:9342–9348.

- Rondou P, Haegeman G, Van Craenenbroeck K (2010) The dopamine D4 receptor: biochemical and signalling properties. *Cell Mol Life Sci* 67:1971–1986.
- Rosenzweig A, Seidman CE (1991) Atrial natriuretic factor and related peptide hormones. *Annu Rev Biochem* 60:229–255.
- Rose RA, Giles WR (2008) Natriuretic peptide C receptor signalling in the heart and vasculature. *J Physiol (Lond)* 586:353–366.
- Rosin A, Lindholm S, Franck J, Georgieva J (1999) Downregulation of kappa opioid receptor mRNA levels by chronic ethanol and repetitive cocaine in rat ventral tegmentum and nucleus accumbens. *Neurosci Lett* 275:1–4.
- Roskoski R Jr, Vulliet PR, Glass DB (1987) Phosphorylation of tyrosine hydroxylase by cyclic GMP-dependent protein kinase. *J Neurochem* 48:840–845.
- Ruffolo RR Jr, Hieble JP (1994) Alpha-adrenoceptors. *Pharmacol Ther* 61:1–64.
- Ruth P, Landgraf W, Keilbach A, May B, Egleme C, Hofmann F (1991) The activation of expressed cGMP-dependent protein kinase isozymes I alpha and I beta is determined by the different amino-termini. *Eur J Biochem* 202:1339–1344.
- Ruth P, Wang GX, Boekhoff I, May B, Pfeifer A, Penner R, Korth M, Breer H, Hofmann F (1993) Transfected cGMP-dependent protein kinase suppresses calcium transients by inhibition of inositol 1,4,5-trisphosphate production. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:2623–2627.
- S**
- Saal D, Dong Y, Bonci A, Malenka RC (2003) Drugs of abuse and stress trigger a common synaptic adaptation in dopamine neurons. *Neuron* 37:577–582.
- Salamone JD, Cousins MS, McCullough LD, Carriero DL, Berkowitz RJ (1994) Nucleus accumbens dopamine release increases during instrumental lever pressing for food but not free food consumption. *Pharmacol Biochem Behav* 49:25–31.
- Sammut S, West AR (2008) Acute cocaine administration increases NO efflux in the rat prefrontal cortex via a neuronal NOS-dependent mechanism. *Synapse* 62:710–713.
- Samson WK, Aguila MC, Bianchi R (1988) Atrial natriuretic factor inhibits luteinizing hormone secretion in the rat: evidence for a hypothalamic site of action. *Endocrinology* 122:1573–1582.
- Sanchis-Segura C, Spanagel R (2006) Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. *Addict Biol* 11:2–38.
- Saper CB, Standaert DG, Currie MG, Schwartz D, Geller DM, Needleman P (1985) Atriopeptin-immunoreactive neurons in the brain: presence in cardiovascular regulatory areas. *Science* 227:1047–1049.
- Satta R, Maloku E, Zhubi A, Pibiri F, Hajos M, Costa E, Guidotti A (2008) Nicotine decreases DNA methyltransferase 1 expression and glutamic acid decarboxylase 67 promoter methylation in GABAergic interneurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:16356–16361.
- Saunders LR, Verdin E (2007) Sirtuins: critical regulators at the crossroads between cancer and aging. *Oncogene* 26:5489–5504.
- Savai R, Pullamsetti SS, Banat G-A, Weissmann N, Ghofrani HA, Grimminger F, Schermuly RT (2010) Targeting cancer with phosphodiesterase inhibitors. *Expert Opin Investig Drugs* 19:117–131.
- Schmidt H, Stonkute A, Jüttner R, Koesling D, Friebe A, Rathjen FG (2009) C-type natriuretic peptide (CNP) is a bifurcation factor for sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:16847–16852.

- Schroeder FA, Penta KL, Matevossian A, Jones SR, Konradi C, Tapper AR, Akbarian S (2008) Drug-induced activation of dopamine D(1) receptor signaling and inhibition of class I/II histone deacetylase induce chromatin remodeling in reward circuitry and modulate cocaine-related behaviors. *Neuropsychopharmacology* 33:2981–2992.
- Schroeder JP, Packard MG (2002) Posttraining intrabasolateral amygdala scopolamine impairs food- and amphetamine-induced conditioned place preferences. *Behav Neurosci* 116:922–927.
- Schultz G, Böhme E, Munske K (1969) Guanyl cyclase. Determination of enzyme activity. *Life Sci* 8:1323–1332.
- Schultz W (2000) Multiple reward signals in the brain. *Nat Rev Neurosci* 1:199–207.
- Schuman EM, Madison DV (1991) A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science* 254:1503–1506.
- Seamans JK, Yang CR (2004) The principal features and mechanisms of dopamine modulation in the prefrontal cortex. *Prog Neurobiol* 74:1–58.
- Shaham Y, Shalev U, Lu L, De Wit H, Stewart J (2003) The reinstatement model of drug relapse: history, methodology and major findings. *Psychopharmacology (Berl)* 168:3–20.
- Simpson DD, Joe GW, Broome KM (2002) A national 5-year follow-up of treatment outcomes for cocaine dependence. *Arch Gen Psychiatry* 59:538–544.
- Simpson DD, Joe GW, Fletcher BW, Hubbard RL, Anglin MD (1999) A national evaluation of treatment outcomes for cocaine dependence. *Arch Gen Psychiatry* 56:507–514.
- Skoubis PD, Maidment NT (2003) Blockade of ventral pallidal opioid receptors induces a conditioned place aversion and attenuates acquisition of cocaine place preference in the rat. *Neuroscience* 119:241–249.
- Smeets DF, Moog U, Weemaes CM, Vaes-Peeters G, Merckx GF, Niehof JP, Hamers G (1994) ICF syndrome: a new case and review of the literature. *Hum Genet* 94:240–246.
- Smith EE, Jonides J (1999) Storage and executive processes in the frontal lobes. *Science* 283:1657–1661.
- 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* 683:264–269.
- Sokoloff P, Diaz J, Le Foll B, Guillin O, Leriche L, Bezard E, Gross C (2006) The dopamine D3 receptor: a therapeutic target for the treatment of neuropsychiatric disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 5:25–43.
- 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* 347:146–151.
- Solomon RL, Corbit JD (1974) An opponent-process theory of motivation. I. Temporal dynamics of affect. *Psychol Rev* 81:119–145.
- 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* 17:960–974.
- Soria G, Mendizábal V, Touriño C, Robledo P, Ledent C, Parmentier M, Maldonado R, Valverde O (2005) Lack of CB1 cannabinoid receptor impairs cocaine self-administration. *Neuropsychopharmacology* 30:1670–1680.
- Standaert DG, Cechetto DF, Needleman P, Saper CB (1987) Inhibition of the firing of vasopressin neurons by atriopeptin. *Nature* 329:151–153.
- Stefano GB, Goumon Y, Casares F, Cadet P, Fricchione GL, Rialas C, Peter D, Sonetti D, Guarna M, Welters ID, Bianchi E (2000) Endogenous morphine. *Trends Neurosci* 23:436–442.
- Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H (1988) A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature* 332:78–81.
- Sudoh T, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H (1990) C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun* 168:863–870.
- Summers RJ, McMartin LR (1993) Adrenoceptors and their second messenger systems. *J Neurochem* 60:10–23.

- Sunahara RK, Guan HC, O'Dowd BF, Seeman P, Laurier LG, Ng G, George SR, Torchia J, Van Tol HH, Niznik HB (1991) Cloning of the gene for a human dopamine D5 receptor with higher affinity for dopamine than D1. *Nature* 350:614–619.
- Sun J, Wang L, Jiang B, Hui B, Lv Z, Ma L (2008) The effects of sodium butyrate, an inhibitor of histone deacetylase, on the cocaine- and sucrose-maintained self-administration in rats. *Neurosci Lett* 441:72–76.
- Szabadits E, Cserép C, Ludányi A, Katona I, Gracia-Llanes J, Freund TF, Nyíri G (2007) Hippocampal GABAergic synapses possess the molecular machinery for retrograde nitric oxide signaling. *J Neurosci* 27:8101–8111.
- Takeuchi A (1987) The transmitter role of glutamate in nervous systems. *Jpn J Physiol* 37:559–572.
- Tamashiro KLK, Wakayama T, Yamazaki Y, Akutsu H, Woods SC, Kondo S, Yanagimachi R, Sakai RR (2003) Phenotype of cloned mice: development, behavior, and physiology. *Exp Biol Med* (Maywood) 228:1193–1200.
- Taqatqeh F, Mergia E, Neitz A, Eysel UT, Koesling D, Mittmann T (2009) More than a retrograde messenger: nitric oxide needs two cGMP pathways to induce hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci* 29:9344–9350.
- Thiriet N, Humblot N, Burgun C, Aunis D, Zwiller J (1998) Cocaine and fluoxetine induce the expression of the hVH-5 gene encoding a MAP kinase phosphatase. *Brain Res Mol Brain Res* 62:150–157.
- Thiriet N, Jouvert P, Gobaille S, Solov'eva O, Gough B, Aunis D, Ali S, Zwiller J (2001) C-type natriuretic peptide (CNP) regulates cocaine-induced dopamine increase and immediate early gene expression in rat brain. *Eur J Neurosci* 14:1702–1708.
- 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* 4:1217–1223.
- Thomas MJ, Malenka RC (2003) Synaptic plasticity in the mesolimbic dopamine system. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* 358:815–819.
- Thomsen M, Han DD, Gu HH, Caine SB (2009) Lack of cocaine self-administration in mice expressing a cocaine-insensitive dopamine transporter. *J Pharmacol Exp Ther* 331:204–211.
- 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* 18:4779–4793.
- Thorpe DS, Morkin E (1990) The carboxyl region contains the catalytic domain of the membrane form of guanylate cyclase. *J Biol Chem* 265:14717–14720.
- Ticku MK, Lowrimore P, Lehoullier P (1986) Ethanol enhances GABA-induced $^{36}\text{Cl}^{-}$ -influx in primary spinal cord cultured neurons. *Brain Res Bull* 17:123–126.
- Torres GE, Amara SG (2007) Glutamate and monoamine transporters: new visions of form and function. *Curr Opin Neurobiol* 17:304–312.

T

- Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R (2010) Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev* 62:405–496.
- Tsankova NM, Berton O, Renthal W, Kumar A, Neve RL, Nestler EJ (2006) Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. *Nat Neurosci* 9:519–525.
- Tsankova N, Renthal W, Kumar A, Nestler EJ (2007) Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* 8:355–367.
- Tsou K, Snyder GL, Greengard P (1993) Nitric oxide/cGMP pathway stimulates phosphorylation of DARPP-32, a dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein, in the substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:3462–3465.
- Tzschentke TM (2007) Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addict Biol* 12:227–462.
- U**
- Uhler MD (1993) Cloning and expression of a novel cyclic GMP-dependent protein kinase from mouse brain. *J Biol Chem* 268:13586–13591.
- Undie AS, Friedman E (1990) Stimulation of a dopamine D1 receptor enhances inositol phosphates formation in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 253:987–992.
- Ungless MA, Whistler JL, Malenka RC, Bonci A (2001) Single cocaine exposure in vivo induces long-term potentiation in dopamine neurons. *Nature* 411:583–587.
- Uzday IT, Celik T, Aydin A, Kayir H, Tokgöz S, Bilgi C (2004) Effects of chronic ethanol administration and ethanol withdrawal on cyclic guanosine 3',5'-monophosphate (cGMP) levels in the rat brain. *Drug Alcohol Depend* 74:55–59.
- V**
- Vaandrager AB, Edixhoven M, Bot AG, Kroos MA, Jarchau T, Lohmann S, Genieser HG, de Jonge HR (1997) Endogenous type II cGMP-dependent protein kinase exists as a dimer in membranes and can be functionally distinguished from the type I isoforms. *J Biol Chem* 272:11816–11823.
- van der Linden AM, Nolan KM, Sengupta P (2007) KIN-29 SIK regulates chemoreceptor gene expression via an MEF2 transcription factor and a class II HDAC. *EMBO J* 26:358–370.
- Vanderschuren LJMJ, Everitt BJ (2004) Drug seeking becomes compulsive after prolonged cocaine self-administration. *Science* 305:1017–1019.
- Vanneste Y, Michel A, Dimaline R, Najdovski T, Deschodt-Lanckman M (1988) Hydrolysis of alpha-human atrial natriuretic peptide in vitro by human kidney membranes and purified endopeptidase-24.11. Evidence for a novel cleavage site. *Biochem J* 254:531–537.
- Van Tol HH, Bunzow JR, Guan HC, Sunahara RK, Seeman P, Niznik HB, Civelli O (1991) Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature* 350:610–614.
- Verdin E, Dequiedt F, Kasler HG (2003) Class II histone deacetylases: versatile regulators. *Trends Genet* 19:286–293.
- Vinklerová J, Nováková J, Sulcová A (2002) Inhibition of methamphetamine self-administration in rats by cannabinoid receptor antagonist AM 251. *J Psychopharmacol (Oxford)* 16:139–143.
- Vocci FJ, Elkashef A (2005) Pharmacotherapy and other treatments for cocaine abuse and dependence. *Curr Opin Psychiatry* 18:265–270.

- Volkow ND, Fowler JS, Wolf AP, Hitzemann R, Dewey S, Bendriem B, Alpert R, Hoff A (1991) Changes in brain glucose metabolism in cocaine dependence and withdrawal. *Am J Psychiatry* 148:621–626.
- Volkow ND, Hitzemann R, Wang GJ, Fowler JS, Wolf AP, Dewey SL, Handlesman L (1992) Long-term frontal brain metabolic changes in cocaine abusers. *Synapse* 11:184–190.
- Volkow ND, Wang GJ, Fischman MW, Foltin RW, Fowler JS, Abumrad NN, Vitkun S, Logan J, Gatley SJ, Pappas N, Hitzemann R, Shea CE (1997) Relationship between subjective effects of cocaine and dopamine transporter occupancy. *Nature* 386:827–830.
- Vorspan F, Brousse G, Bloch V, Bellais L, Romo L, Guillem E, Coeuru P, Lépine J-P (2012) Cocaine-induced psychotic symptoms in French cocaine addicts. *Psychiatry Res* [Epub ahead of print].
- Walter U, Eigenthaler M, Geiger J, Reinhard M (1993) Role of cyclic nucleotide-dependent protein kinases and their common substrate VASP in the regulation of human platelets. *Adv Exp Med Biol* 344:237–249.
- Walter W, Clynes D, Tang Y, Marmorstein R, Mellor J, Berger SL (2008) 14-3-3 interaction with histone H3 involves a dual modification pattern of phosphoacetylation. *Mol Cell Biol* 28:2840–2849.
- Walther DJ, Peter J-U, Bashammakh S, Hörtnagl H, Voits M, Fink H, Bader M (2003) Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science* 299:76.
- Wang L, Lv Z, Hu Z, Sheng J, Hui B, Sun J, Ma L (2010) Chronic cocaine-induced H3 acetylation and transcriptional activation of CaMKIIalpha in the nucleus accumbens is critical for motivation for drug reinforcement. *Neuropsychopharmacology* 35:913–928.
- Wang Q, Simpao A, Sun L, Falk JL, Lau CE (2001) Contribution of the active metabolite, norcocaine, to cocaine's effects after intravenous and oral administration in rats: pharmacodynamics. *Psychopharmacology (Berl)* 153:341–352.
- Wang X, Robinson PJ (1997) Cyclic GMP-dependent protein kinase and cellular signaling in the nervous system. *J Neurochem* 68:443–456.
- Waschek JA (2004) Developmental actions of natriuretic peptides in the brain and skeleton. *Cell Mol Life Sci* 61:2332–2342.
- Weaver ICG, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, Dymov S, Szyf M, Meaney MJ (2004) Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci* 7:847–854.
- Weihe E, Schäfer MK, Erickson JD, Eiden LE (1994) Localization of vesicular monoamine transporter isoforms (VMAT1 and VMAT2) to endocrine cells and neurons in rat. *J Mol Neurosci* 5:149–164.
- Weiner DM, Levey AI, Sunahara RK, Niznik HB, O'Dowd BF, Seeman P, Brann MR (1991) D1 and D2 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:1859–1863.
- Weinshenker D, Schroeder JP (2007) There and back again: a tale of norepinephrine and drug addiction. *Neuropsychopharmacology* 32:1433–1451.
- Weissenborn R, Robbins TW, Everitt BJ (1997) Effects of medial prefrontal or anterior cingulate cortex lesions on responding for cocaine under fixed-ratio and second-order schedules of reinforcement in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 134:242–257.
- Wernet W, Flockerzi V, Hofmann F (1989) The cDNA of the two isoforms of bovine cGMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett* 251:191–196.
- Wiggins AK, Shen P-J, Gundlach AL (2003) Atrial natriuretic peptide expression is increased in rat cerebral cortex following spreading depression: possible contribution to sd-induced neuroprotection. *Neuroscience* 118:715–726.
- Wightman F, Ellenberg P, Churchill M, Lewin SR (2012) HDAC inhibitors in HIV. *Immunol Cell Biol* 90:47–54.

W

- Wilcox JN, Augustine A, Goeddel DV, Lowe DG (1991) Differential regional expression of three natriuretic peptide receptor genes within primate tissues. *Mol Cell Biol* 11:3454–3462.
- Wilson CJ (2007) GABAergic inhibition in the neostriatum. *Prog Brain Res* 160:91–110.
- Wilson RI, Nicoll RA (2002) Endocannabinoid signaling in the brain. *Science* 296:678–682.
- Winter S, Simboeck E, Fischle W, Zupkovitz G, Dohnal I, Mechtler K, Ammerer G, Seiser C (2008) 14-3-3 proteins recognize a histone code at histone H3 and are required for transcriptional activation. *EMBO J* 27:88–99.
- Wirtshafter D, Sheppard AC (2001) Localization of GABA(B) receptors in midbrain monoamine containing neurons in the rat. *Brain Res Bull* 56:1–5.
- Wiseman EJ, McMillan DE (1996) Combined use of cocaine with alcohol or cigarettes. *Am J Drug Alcohol Abuse* 22:577–587.
- Wise RA (1980) Action of drugs of abuse on brain reward systems. *Pharmacol Biochem Behav* 13 Suppl 1:213–223.
- Wise RA, Bozarth MA (1985) Brain mechanisms of drug reward and euphoria. *Psychiatr Med* 3:445–460.
- Witkin JM, Goldberg SR (1990) Effects of cocaine on locomotor activity and schedule-controlled behaviors of inbred rat strains. *Pharmacol Biochem Behav* 37:339–342.
- Wong CCY, Mill J, Fernandes C (2011) Drugs and addiction: an introduction to epigenetics. *Addiction* 106:480–489.

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* 81:155–163.
- Yandle TG (1994) Biochemistry of natriuretic peptides. *J Intern Med* 235:561–576.
- Yasoda A, Kitamura H, Fujii T, Kondo E, Murao N, Miura M, Kanamoto N, Komatsu Y, Arai H, Nakao K (2009) Systemic administration of C-type natriuretic peptide as a novel therapeutic strategy for skeletal dysplasias. *Endocrinology* 150:3138–3144.
- Yeoh JW, James MH, Jobling P, Bains JS, Graham BA, Dayas CV (2012) Cocaine potentiates excitatory drive in the perifornical/lateral hypothalamus. *J Physiol* 590: 3677–3689

Z

- Zhang KYJ, Card GL, Suzuki Y, Artis DR, Fong D, Gillette S, Hsieh D, Neiman J, West BL, Zhang C, Milburn MV, Kim S-H, Schlessinger J, Bollag G (2004) A glutamine switch mechanism for nucleotide selectivity by phosphodiesterases. *Mol Cell* 15:279–286.
- Zhang Y, Ng HH, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Bird A, Reinberg D (1999) Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev* 13:1924–1935.
- Zhang Y, Reinberg D (2001) Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev* 15:2343–2360.
- Zhao Z, Ma L (2009) Regulation of axonal development by natriuretic peptide hormones. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:18016–18021.
- Zhuo M, Hawkins RD (1995) Long-term depression: a learning-related type of synaptic plasticity in the mammalian central nervous system. *Rev Neurosci* 6:259–277.

Zigmond RE, Schwarzschild MA, Rittenhouse AR (1989)
Acute regulation of tyrosine hydroxylase by nerve
activity and by neurotransmitters via
phosphorylation. *Annu Rev Neurosci* 12:415–461.



Elodie DESCHATRETTES

L'activation de la voie du GMP cyclique réduit le comportement d'auto-administration de cocaïne chez le rat. Implication de régulations épigénétiques.



Résumé

Nous avons étudié l'influence de la voie du cGMP sur le comportement d'auto-administration de cocaïne chez le rat. Les injections, dans le cortex préfrontal médian, de trois activateurs différents de cette voie diminuent le nombre d'injections que les rats déclenchent, indiquant une réduction de l'effet renforçant de la cocaïne et de leur motivation pour la drogue. Des études immunohistochimiques nous ont permis de mettre en évidence que cette effet comportemental s'accompagnait d'une diminution de l'expression de marqueurs épigénétiques (MeCP2, HDAC2) et d'une augmentation des niveaux d'acétylation des histones. Des résultats complémentaires confirment que la voie du cGMP est bien en mesure de réguler des protéines impliquées dans les mécanismes épigénétiques. La découverte d'une action *via* ces régulations nous permet de suggérer des pistes originales quant aux phénomènes mis en jeu dans la diminution observée des propriétés renforçantes de la cocaïne.

Mots-clés : cocaïne, auto-administration, GMPc, épigénétique

Abstract

We studied the influence of the cGMP pathway on cocaine self-administration by rats. When injected in the medial prefrontal cortex, three distinct activators of this pathway reduced the number of self-injections triggered by rats, suggesting a reduction of the reinforcing properties of cocaine and a lesser motivation of the animals for the drug. Immunohistochemical studies revealed that this behavioural effect was accompanied by a reduced expression of epigenetic markers (MeCP2, HDAC2), as well as increased levels of histone acetylation. Complementary results indicate that the cGMP pathway is indeed able to regulate proteins implied in epigenetic mechanisms. The uncovering of an implication of these types of regulations leads us to suggest original hypotheses about the processes underlying the reduction of the reinforcing properties of cocaine.

Keywords : cocaine, self-administration, cGMP, epigenetics