



HAL
open science

La modification de la méthylation de l'ADN régule le comportement d'auto-administration de cocaïne chez le rat : caractérisation des gènes impliqués

Mathieu Fonteneau

► To cite this version:

Mathieu Fonteneau. La modification de la méthylation de l'ADN régule le comportement d'auto-administration de cocaïne chez le rat : caractérisation des gènes impliqués. Neurobiologie. Université de Strasbourg, 2014. Français. NNT : 2014STRAJ059 . tel-01239470

HAL Id: tel-01239470

<https://theses.hal.science/tel-01239470v1>

Submitted on 7 Dec 2015

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.



UNIVERSITÉ DE STRASBOURG



École Doctorale
des Sciences de la Vie
et de la Santé
STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

**Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives
CNRS UMR 7364**

THÈSE présentée par :
Mathieu Fonteneau

soutenue le : 24 septembre 2014

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

Discipline/Spécialité : Neurosciences

**La modification de la méthylation de
l'ADN régule le comportement d'auto-
administration de cocaïne chez le rat.
Caractérisation des gènes impliqués.**

THÈSE dirigée par :

Mr ZWILLER Jean

Docteur, CNRS

RAPPORTEURS :

Mme DAUGÉ Valérie

Docteur, CNRS

Mme THIRIET Nathalie

Docteur, Université de Poitiers

AUTRE MEMBRE DU JURY :

Mr CHATTON Bruno

Professeur, Université de Strasbourg

REMERCIEMENTS

Je tiens en premier lieu à remercier le Professeur Jean-Christophe Cassel de m'avoir accueilli au sein du LNCA pendant ces trois années de doctorat, trois années qui resteront gravées dans ma mémoire.

J'adresse également tous mes remerciements au Docteur Jean Zwiller pour m'avoir accepté dans son équipe, encadré et aidé tout au long de cette thèse et enseigné les tenants et les aboutissants du métier de chercheur.

Je remercie les Docteurs Valérie Daugé et Nathalie Thiriet ainsi que le Professeur Bruno Chatton d'avoir accepté de juger ce travail de thèse.

Merci Pascal, mon ami, pour toute ton aide, ton soutien, tout ce que tu m'as appris et tout le reste encore. J'aurais tant à dire mais tu le sais déjà. Je pourrais t'inclure dans tous les paragraphes suivants (sauf le dernier...) mais tu as le tien. Sans toi, je n'en serai pas là.

Merci Dom pour ta contribution concernant l'expression des gènes différentiellement méthylés et merci à tous les autres membres de l'équipe passés et présents pour toutes les discussions et coup de mains apportés au cours de ces trois ans.

Je remercie tous les membres de l'équipe et du laboratoire pour leur aide et leur bonne humeur, en particulier tous les doctorants pour les moments vécus dans le bureau, au labo, dans la salle d'AA, autour d'une partie de tarot, de pétanque ou d'une bière. Marco, Sarah, Mickaël, Élodie, Carolina, les deux JB, Fanny, les Romain, Lucas, PH, Thibault et tous les autres et puis les copains de promo et de monitorat, Fred, Salim, Mus', Carol, Audrey, Caro, Florent, Romain, Alex, Élise et beaucoup d'autres encore....merci. Un énorme sourire à l'évocation de ces longues nuits de discussions scientifiques en compagnie du Greg et du grand Matthieu, échanges pas toujours probants mais ô combien éloquents.

Merci à toutes les personnes rencontrées au cours de ma vie, elles ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui et m'ont donc quelque part permis d'accomplir ces trois années et d'écrire ce manuscrit, en particulier et surtout mes parents mais aussi mes amis et mes professeurs tout au long de mon cursus ; une pensée pour Catherine Dahm-Dupuis, Catherine Hauck, Pierre Veinante et Sylvain Hugel pour m'avoir fait apprécier la magie de l'enseignement.

Merci enfin à Clémence, pour m'avoir soutenu et aidé tout au long de la rédaction de ce manuscrit, dans le Jura et ailleurs, heureusement que nous nous sommes rencontrés...

TABLE DES MATIÈRES

CONTEXTE SCIENTIFIQUE	13
Chapitre I : Cocaïne et système nerveux central.....	
A - Introduction	15
<i>A.1 Usages et épidémiologie</i>	15
<i>A.2 Pharmacocinétique</i>	15
<i>A.3 Effets neurologiques et somatiques</i>	16
A.3.1 Chez l'homme	
A.3.2 Chez le rat	
B - Dépendance à la cocaïne	19
<i>B.1 Généralités</i>	19
<i>B.2 Facteurs de vulnérabilité</i>	19
<i>B.3 Critères du diagnostic</i>	20
<i>B.4 Théories de la dépendance</i>	21
B.4.1 Renforcements positif et négatif	
B.4.2 Théorie de l'allostase	
B.4.3 Apprentissage procédural	
B.4.4 Sensibilisation de la motivation	
<i>B.5 Approches thérapeutiques</i>	24
<i>B.6 Modèle animal</i>	25
B.6.1 Activité locomotrice et sensibilisation comportementale	
B.6.2 Préférence de place conditionnée	
B.6.3 Auto-administration de cocaïne	
C - Neurobiologie cellulaire de la cocaïne	28
<i>C.1 Mécanisme d'action</i>	28
<i>C.2 Le circuit de récompense</i>	29
<i>C.3 Système dopaminergique</i>	30
C.3.1 Les projections du mésencéphale	
C.3.2 La synapse dopaminergique	
C.3.3 Cocaïne et système dopaminergique	
<i>C.4 Système sérotoninergique</i>	33
C.4.1 Les voies sérotoninergiques	
C.4.2 La synapse sérotoninergique	
C.4.3 Cocaïne et système sérotoninergique	
<i>C.5 Autres systèmes de neurotransmission</i>	35

Chapitre II : Méthylation de l'ADN dans le cerveau adulte.....	
A - Les régulations épigénétiques	36
<i>A.1 Définitions</i>	36
<i>A.2 Dynamique de la chromatine</i>	36
B - Les modifications post-traductionnelles des histones	38
<i>B.1 Un ensemble de combinaisons</i>	38
<i>B.2 L'acétylation des histones</i>	39
B.2.1 Les histones acétyltransférases	
B.2.2 Les histones désacétylases	
<i>B.3 Histones acétyltransférases, histones désacétylases et cocaïne</i>	41
C - La méthylation de l'ADN	42
<i>C.1 De multiples rôles</i>	42
<i>C.2 A travers le génome</i>	42
<i>C.3 Fonctions de la 5-méthylcytosine</i>	45
C.3.1 Répression de la transcription	
C.3.2 Le paradoxe de la méthylation de l'ADN	
C.3.3 Méthylation intragénique	
<i>C.4 Les ADN méthyltransférases</i>	48
<i>C.5 Les inhibiteurs des ADN méthyltransférases</i>	50
<i>C.6 La méthylation : un processus dynamique</i>	52
<i>C.7 Méthylation et plasticité neuronale</i>	54
<i>C.8 Implications dans les pathologies</i>	55
<i>C.9 Méthylation de l'ADN et acétylation des histones</i>	55
<i>C.10 Auto-administration de cocaïne et épigénétique</i>	56
OBJECTIFS DE THÈSE	59
RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX	63
Chapitre I : Les inhibiteurs des ADN méthyltransférases régulent le comportement d'auto-administration de cocaïne.....	
A - Augmentation de la consommation de cocaïne	65
B - Augmentation des propriétés renforçantes	68
C - Un effet restreint au protocole de ratio fixe	69
Chapitre II : Caractérisation des gènes différentiellement méthylés.....	
A - Analyse du méthylome	72
<i>A.1 Protocole utilisé : séquençage « nouvelle génération »</i>	72

A.2 Régions différentiellement méthylées	74
A.3 Gènes différentiellement méthylés	76
A.4 Effets du traitement par la cocaïne et la 5-aza-2'-désoxycytidine	77
A.4.1 Au niveau des gènes et des régions différentiellement méthylées	
A.4.2 Au niveau des îlots CpG	
A.4.3 Les effets de la cocaïne et de la 5-aza-2'-désoxycytidine ne sont pas indépendants	
B - Gènes présentant une méthylation modifiée	81
B.1 Le cas particulier du gène <i>Hdac2</i>	82
B.2 Les autres gènes validés à la fois par méthylation différentielle et par expression	85
B.2.1 <i>Rock1</i>	
B.2.2 <i>Cnrip1</i>	
B.3 Les gènes déjà connus pour être régulés par méthylation	90
B.3.1 <i>Reln</i>	
B.3.2 <i>Cdkl5</i>	
B.4 Gènes « validés » uniquement par leurs niveaux d'expression	91
B.4.1 <i>Arhgef9</i> , un gène déméthylé et induit par la cocaïne	
B.4.2 Le cas de <i>Pak3</i> , <i>Agap2</i> et <i>Ip6k2</i> : des régions différentiellement méthylées dont le sens de variation de la méthylation est opposé	
B.5 Gènes non différentiellement exprimés	95
DISCUSSION GÉNÉRALE	99
Chapitre I : Méthylation de l'ADN et comportement de prise de drogue.....	
A - Les inhibiteurs des ADN méthyltransférases augmentent les propriétés renforçantes de la cocaïne	101
B - Critiques	103
C - Perspectives	104
Chapitre II : Analyse du méthylome.....	
A - Sur l'ensemble du génome	105
B - Effets de la cocaïne	107
C - Effets de la 5-aza-2'-désoxycytidine	107
D - Mode d'action de la 5-aza-2'-désoxycytidine	108
D.1 <i>Dans les neurones</i>	108
D.2 <i>La 5-aza-2'-désoxycytidine, un agent déméthylant ?</i>	108
E - Limites et perspectives	110
Chapitre III : Gènes différentiellement méthylés.....	
A - Cocaïne et méthylation de gènes	111

B - Corrélation entre méthylation et expression	112
C - Méthylation et plasticité	114
D - Méthylation et drogues	115
E - Critiques et perspectives	115
F - Conclusion générale	116
G - Publications et communications scientifiques	117
MATÉRIELS ET MÉTHODES	129
Chapitre I : Procédures comportementales.....	
A - Animaux	131
B - Traitements pharmacologiques	133
C - Auto-administration de cocaïne	133
<i>C.1 Cocaïne</i>	<i>133</i>
<i>C.2 Appareillage</i>	<i>133</i>
<i>C.3 Protocoles utilisés</i>	<i>134</i>
C.3.1 Ratio fixe	
C.3.2 Dose-réponse de cocaïne	
C.3.3 Ratio progressif	
C.3.4 Réactivation du comportement de recherche de cocaïne	
<i>C.4 Analyse des résultats et statistiques</i>	<i>135</i>
Chapitre II : Méthylation et expression.....	
A - Prélèvement des structures cérébrales	136
B - Analyse de la méthylation	136
<i>B.1 Extraction de l'ADN génomique</i>	<i>136</i>
<i>B.2 Sonication et enrichissement en fragments d'ADN méthylés</i>	<i>137</i>
<i>B.3 PCR quantitative</i>	<i>138</i>
C - Expression	140
C.1 RT-qPCR	140
C.1.1 Extraction des ARNs et transcription inverse	
C.1.2 PCR quantitative	
C.2 Western Blot	142
C.2.1 Extraction de la fraction nucléaire	
C.2.2 Dosage des protéines	
C.2.3 Immunoblot	
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	145

INDEX DES ILLUSTRATIONS ET TABLEAUX

Figure 1 : Mécanisme d'action de la cocaïne au niveau de la synapse.....	28
Figure 2 : Système dopaminergique mésocorticolimbique et afférences majeures sur l'aire tegmentale ventrale et le noyau accumbens chez le rat (Kauer et Malenka, 2007).....	29
Figure 3 : Organisation des projections entre striatum et noyaux dopaminergiques du mésencéphale (Haber, 2003).....	31
Figure 4 : Transport des monoamines (Kristensen <i>et al.</i> , 2011).....	32
Figure 5 : Niveaux de compaction de la chromatine (Brodeur et Toussaint, 2007).....	37
Figure 6 : Acétylation des histones (Gong et Miller, 2013).....	39
Figure 7 : Distribution génomique des îlots CpG (Deaton et Bird, 2011).....	46
Figure 8 : Densité de méthylation chez le rat (Sati <i>et al.</i> , 2012).....	46
Figure 9 : Structure de composés inhibant les ADN méthyltransférases (Foulks <i>et al.</i> , 2012).....	50
Figure 10 : Voie de déméthylation active par les « Ten-Eleven-Translocation proteins » (Kohli et Zhang, 2013).....	53
Figure 11 : Effet de l'injection intracérébroventriculaire d'inhibiteurs des ADN méthyltransférases sur la consommation de cocaïne de rats soumis à un protocole de ratio fixe 5.....	66
Figure 12 : Effet dose-dépendant des inhibiteurs des ADN méthyltransférases sur la consommation de cocaïne sous le protocole de ratio fixe 5.....	67
Figure 13 : Effet de la 5-aza-2'-désoxycytidine dans un protocole de dose-réponse à la cocaïne.....	68
Figure 14 : Effet des inhibiteurs des ADN méthyltransférases sur le comportement d'auto-administration sous un protocole de ratio progressif.....	70
Figure 15 : Effet de la 5-aza-2'-désoxycytidine sur la réactivation du comportement de recherche de cocaïne après sevrage.....	70
Figure 16 : Analyse du méthylome.....	73
Figure 17 : Position des régions différentiellement méthylées à travers le génome.....	74
Figure 18 : Position des régions différentiellement méthylées comprenant au moins un îlot CpG...	75
Figure 19 : Gènes différentiellement méthylés.....	76
Figure 20 : Effets de la cocaïne et de la 5-aza-2'-désoxycytidine sur le sens de variation de la méthylation.....	78
Figure 21 : Corrélation entre le sens de variation de la méthylation induit par les deux traitements	80
Figure 22 : Quantification et représentation graphique de la densité de méthylation des régions différentiellement méthylées de <i>Hdac2</i>	83
Figure 23 : L'auto-administration de cocaïne diminue la méthylation et augmente l'expression de <i>Hdac2</i> dans le cortex préfrontal médian.....	84

Figure 24 : L'auto-administration de cocaïne augmente l'expression de <i>Hdac2</i> dans le striatum.....	85
Figure 25 : La cocaïne et la 5-aza-2'-désoxycytidine modifient peu la méthylation et l'expression de <i>Rock1</i> dans le cortex préfrontal médian.....	86
Figure 26 : Représentation des régions différentiellement méthylées de <i>Rock1</i> issues de l'analyse du méthylome.....	87
Figure 27 : La cocaïne et la 5-aza-2'-désoxycytidine régulent la méthylation et l'expression de <i>Cnrip1</i> dans le cortex préfrontal médian.....	88
Figure 28 : Représentation des régions différentiellement méthylées de <i>Cnrip1</i> issues de l'analyse du méthylome.....	89
Figure 29 : La 5-aza-2'-désoxycytidine augmente l'expression de <i>Reln</i> dans le striatum et non dans le cortex préfrontal médian.....	90
Figure 30 : Représentation de la région différentiellement méthylée de <i>Arhgef9</i> issue de l'analyse du méthylome.....	92
Figure 31 : L'auto-administration de cocaïne augmente l'expression de <i>Arhgef9</i> dans le cortex préfrontal médian.....	93
Figure 32 : Régulation de l'expression de <i>Pak3</i> et <i>Agap2</i> dans le cortex préfrontal médian.....	94
Figure 33 : L'auto-administration de cocaïne augmente l'expression de <i>Ip6k2</i> dans le cortex préfrontal médian.....	95
Figure 34 : La cocaïne et la 5-aza-2'-désoxycytidine ne modifient pas l'expression de <i>Arf6</i> dans le cortex préfrontal médian.....	96
Figure 35 : Représentation de la région différentiellement méthylée de <i>Arf6</i> issue de l'analyse du méthylome.....	97
Figure 36 : Signalisation cellulaire liée à la dynamique du cytosquelette d'actine dans les synapses (Ba <i>et al.</i> , 2013).....	112
Figure 37 : Système de cathétérisation.....	132
Figure 38 : Emplacement des guide-canules et canules d'injection.....	132
Figure 39 : Appareillage d'auto-administration.....	134
Tableau 1 : Critères de la dépendance selon le DSM-V (American Psychiatric Association, 2013).	21
Tableau 2 : Histones désacétylases (Lane et Chabner, 2009).....	40
Tableau 3 : Effets de la cocaïne et/ou de la 5-aza-2'-désoxycytidine selon la position des régions différentiellement méthylées.....	79
Tableau 4 : Effets de la cocaïne et/ou de la 5-aza-2'-désoxycytidine selon la position des régions différentiellement méthylées se trouvant dans des îlots CpG.....	79
Tableau 5 : Liste des amorces de qPCR pour l'analyse des régions différentiellement méthylées. .	138
Tableau 6 : Liste des amorces de qPCR utilisées pour mesurer l'expression des gènes.....	141

ABBREVIATIONS

5-dAZA :	5-aza-2'-désoxycytidine
5-HT :	5-hydroxytryptamine ou sérotonine
5-hmC :	5-hydroxyméthylcytosine
5-mC :	5-méthylcytosine
AA :	auto-administration
AID :	« activation-induced cytidine deaminase »
APOBEC :	« apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like »
ATV :	aire tegmentale ventrale
CGI :	îlot CpG
CPF :	cortex préfrontal
CPFm :	cortex préfrontal médian
CpG :	dinucléotide cytidine-phosphate-guanosine
CPu :	noyau caudé-putamen
DA :	dopamine
DAT :	transporteur membranaire de la dopamine
DMR :	région génomique différenciellement méthylée
DNMT :	ADN méthyltransférase
FR :	« fixed ratio »
HAT :	histone acétyltransférase
HDAC :	histone désacétylase
ICV :	intracérébroventriculaire
MBD :	« methyl-CpG-binding domain protein »
MeCP2 :	« methyl-CpG-binding protein 2 »
MeDIP :	immunoprécipitation dirigée contre l'ADN méthylé
NAc :	noyau accumbens
NET :	transporteur membranaire de la noradrénaline
NP :	« nose-poke »
qPCR :	« quantitative polymerase chain reaction »
PR :	« progressive ratio »
RT-qPCR :	transcription inverse suivie d'une PCR quantitative
SERT :	transporteur membranaire de la sérotonine
SN :	substance noire
SNC :	système nerveux central
TSS :	« transcription start site » ou site d'initiation de la transcription
UTR :	« untranslated regions » ou régions non traduites

Contexte

Scientifique

Chapitre I : Cocaïne et système nerveux central

A - Introduction

A.1 Usages et épidémiologie

Contenue dans les feuilles de l'arbuste *Erythroxylon coca*, la cocaïne est un pesticide naturel fournissant à la plante une protection contre les insectes (Nathanson *et al.*, 1993). Elle a été isolée en 1860 par Albert Niemann et employée dès 1884 dans le domaine médical pour ses propriétés anesthésiques locales (Pilcher, 1886). Utilisée aujourd'hui pour ses propriétés psychostimulantes, la cocaïne est consommée sous forme de chlorhydrate de cocaïne par voie intranasale ou intraveineuse, ou fumée sous sa forme basique insoluble dans l'eau, le « crack ». Son usage et son commerce ont été réglementés dès le début du siècle aux Etats-Unis (Harrison Narcotic Tax Act, 1914) puis prohibés dans la plupart des pays par les Nations Unies (United Nations Conference for the Adoption of a Single Convention on Narcotic Drugs, 1961).

D'après le rapport de l'Office des Nations Unies contre la Drogue et le Crime, 17 millions de personnes dans le monde ont consommé de la cocaïne au cours de l'année 2012, ce qui équivaut à 0,37 % de la population des 15-64 ans. Bien que la quasi-totalité de la production de cocaïne soit concentrée en Bolivie, Colombie et Pérou, son usage est majoritairement répandu en Amérique du Nord (27 %), Amérique Latine et Caraïbes (24 %) et Europe Centrale et Occidentale (21 %) (United Nations Office on Drugs and Crime, 2013). En 2005, en France, la cocaïne occupait le second rang des produits illicites les plus consommés avec 0,6 % des 15-65 ans en ayant consommé au moins une fois dans l'année, contre 8,6 % pour le cannabis, 0,5 % pour l'ecstasy et 0,1 % pour l'héroïne (Haute Autorité de Santé, 2010).

A.2 Pharmacocinétique

La vitesse d'absorption et de distribution de la cocaïne dans l'organisme dépend du mode d'administration utilisé par le consommateur : voie respiratoire, intraveineuse, intranasale ou orale. Les effets ressentis par les consommateurs sont directement corrélés à la concentration plasmatique (Van Dyke *et al.*, 1982). Lors de l'inhalation par voie intranasale (mode d'administration le plus courant), la concentration plasmatique augmente dès les premières minutes après la prise pour atteindre un pic après environ 30 minutes alors que par voie intraveineuse, le pic plasmatique a lieu

dans les premières minutes suivant l'injection (Javaid *et al.*, 1978). L'absorption la plus rapide correspond à l'administration par voie respiratoire, c'est à dire lorsque la cocaïne est fumée sous forme de « crack » (Jeffcoat *et al.*, 1989). La demi-vie plasmatique de la cocaïne est de 40 à 60 minutes chez l'homme (Javaid *et al.*, 1983) et d'environ 15 minutes chez le rat (Lau *et al.*, 1999).

Bien que l'on puisse retrouver de la cocaïne (ou méthylbenzoylecgonine) non dégradée dans les urines, la majorité de la drogue est transformée en divers métabolites sous l'action d'estérases hépatiques et plasmatiques (Nayak *et al.*, 1976; Allen, 2011). Une faible proportion de cocaïne subit une N-déméthylation dans le foie par le biais du cytochrome P450 et est métabolisée en norcocaïne, métabolite ayant des propriétés renforçantes similaires à la cocaïne (Inaba, 1989).

De manière fréquente, la consommation de cocaïne est associée à celle d'alcool, menant ainsi, par estérification croisée dans le foie, à la formation de cocaéthylène ou éthylbenzoylecgonine (Jatlow *et al.*, 1991). L'élimination de la cocaéthylène étant beaucoup plus lente, la prise d'alcool permet ainsi de prolonger les effets d'une prise de cocaïne. (McCance *et al.*, 1995).

A.3 Effets neurologiques et somatiques

A.3.1 Chez l'homme

a) Prise aiguë de cocaïne

La cocaïne est un puissant stimulant du système nerveux central (SNC). Les effets recherchés par les consommateurs interviennent dans les secondes ou minutes qui suivent la prise selon le mode d'administration utilisé. Ils se traduisent par une forte sensation d'euphorie, une diminution de l'appétit et du besoin de sommeil, un accroissement de la vigilance et de l'acuité mentale et une amélioration des performances physiques. Cependant, la forte activation du système nerveux autonome sympathique entraîne une hyperthermie, une puissante vasoconstriction et une augmentation du rythme cardiaque, pouvant avoir pour conséquences des ischémies et des accidents vasculaires (Johanson et Fischman, 1989). Dans certains cas, une surdose peut aboutir au décès par œdème pulmonaire (Perper et Van Thiel, 1992). La cocaïne peut également déclencher des spasmes musculaires, voire des convulsions du fait de l'abaissement du seuil épileptogène.

Dans un second temps, l'effet euphorisant de la cocaïne laisse place à une période de « descente » caractérisée par une forte fatigue accompagnée d'anxiété et souvent de symptômes dépressifs.

b) Effets délétères dus à un usage chronique

L'usage répété de cocaïne peut conduire à l'apparition d'arythmies, voire d'infarctus du myocarde (Chakko, 2002). Les ischémies et hémorragies engendrées peuvent provoquer la nécrose de tissus sanguins et respiratoires, une rhabdomyolyse, occasionner une insuffisance rénale (Welch *et al.*, 1991) ou une atrophie cérébrale diffuse (Pascual-Leone *et al.*, 1991). Ces troubles vasculaires peuvent se maintenir plusieurs années, même après l'arrêt de la consommation (Volkow *et al.*, 1992).

De nombreux dysfonctionnements neuropsychologiques apparaissent chez les usagers chroniques de cocaïne : perturbations du sommeil, hypervigilance, irritabilité (Gawin et Ellinwood, 1988), troubles de la mémoire et du langage (Ardila *et al.*, 1991). Certains individus développent des psychoses qui sont caractérisées par l'apparition de stéréotypies, de délires paranoïdes et d'hallucinations sensorielles (Post, 1975).

La cocaïne affecte également les comportements sexuels en provoquant d'une part des dysfonctionnements de l'axe gonadotrope (Mendelson *et al.*, 1989), des troubles de l'érection et de l'orgasme (Cocores *et al.*, 1988), mais aussi des risques accrus de transmission de maladies sexuellement transmissibles dus à la désinhibition engendrée par la drogue. De plus, la cocaïne ayant des effets immunosuppresseurs, les usagers développent une hypervulnérabilité aux maladies infectieuses (Watzl et Watson, 1990).

Enfin, une partie des consommateurs chroniques développent une dépendance (voir B) vis-à-vis de la cocaïne, un trouble psychiatrique principalement caractérisé par une prise compulsive de drogue.

A.3.2 Chez le rat

Au niveau comportemental, l'effet le plus spectaculaire est l'augmentation rapide et transitoire de l'activité locomotrice suite à l'injection aiguë de cocaïne, cette hyperlocomotion devenant de plus en plus importante au fur et à mesure des injections successives ; c'est le phénomène de sensibilisation locomotrice (Reith, 1986). L'augmentation de la dose de cocaïne entraîne l'apparition de mouvements stéréotypés (mâchonnements, redressements sur pattes arrière, oscillations de la tête...), voire de convulsions. On retrouve également des effets semblables à ceux observés chez l'homme au niveau de la diminution de la prise de nourriture (Balopole *et al.*, 1979) ainsi que des perturbations du sommeil (Hill *et al.*, 1977). De même, au niveau somatique, l'action

sympathomimétique de la cocaïne est similaire : augmentation de la pression artérielle et du rythme cardiaque (Kiritsy-Roy *et al.*, 1990; Tella *et al.*, 1992).

Au niveau neuropsychologique, on observe, de manière générale, un comportement de type anxiogène suite à un traitement chronique par la cocaïne ainsi que pendant le sevrage, c'est-à-dire à l'arrêt de l'administration répétée de drogue (Rogerio et Takahashi, 1992; Sarnyai *et al.*, 1995). Cependant, un effet anxiogène de la cocaïne peut apparaître selon la dose administrée (Kohtz *et al.*, 2010), un phénomène corrélé avec l'état affectif des rongeurs, mesuré par la fréquence de leurs vocalises (Barker *et al.*, 2010). Enfin, de manière similaire à l'état d'euphorie/dysphorie induit par l'administration de cocaïne chez l'homme, on observe chez les rongeurs une augmentation transitoire des ultrasons de fréquences associées à un état « plaisant » au début de la prise de cocaïne, laissant place, lorsque le seuil de satiété des animaux n'est pas atteint à des fréquences témoignant d'un état de stress (Barker *et al.*, 2013).

B - Dépendance à la cocaïne

B.1 Généralités

La dépendance est un trouble psychiatrique chronique caractérisé essentiellement par un usage compulsif et un désir irrésistible de consommer la substance et ceci, en dépit du fait que le patient a conscience des conséquences néfastes liées à cette consommation (Goodman, 1990).

On peut distinguer plusieurs phases dans le processus de consommation. La première phase est celle du premier contact avec la drogue. Par définition, l'effet renforçant de la cocaïne a tendance à pousser le consommateur d'un jour à s'administrer de nouveau la drogue. Chez certains individus, cette phase de prise contrôlée est suivie d'une phase dite d'abus où la consommation entraîne des conséquences psychoaffectives néfastes pour l'utilisateur ou son entourage. Enfin, chez une minorité des consommateurs, un processus durable et persistant se met en place : c'est la phase de dépendance. D'après une étude américaine, 15 à 16 % des consommateurs deviennent dépendants après une durée d'exposition de dix ans à la cocaïne (Wagner et Anthony, 2002).

Malgré les essais récurrents pour arrêter leur consommation de drogue, le taux de rechute, c'est-à-dire la reprise d'une consommation de façon compulsive, est élevé. D'après la Substance Abuse and Mental Health Service Administration, il serait de l'ordre de 55 % pour les usagers de cocaïne non fumée et de 84 % pour ceux fumant du crack. Des facteurs tels que le stress, la réexposition à la drogue ou le contexte environnemental associé à la prise de drogue peuvent induire cette réinstallation de la consommation. Ce phénomène de rechute peut intervenir après de longues périodes de sevrage de plusieurs mois, voire plusieurs années.

B.2 Facteurs de vulnérabilité

Un certain nombre de paramètres peuvent induire une prédisposition à développer la pathologie chez certains individus. Les facteurs de vulnérabilité sont soit intrinsèques au patient (susceptibilité génétique, sensibilité propre à l'individu) soit externes (environnement et contexte social, modalités de consommation de la drogue).

Concernant les facteurs de susceptibilité génétique, la présence d'allèles particuliers de certains gènes est associée à une augmentation des risques de développer une dépendance vis-à-vis d'une drogue. Par exemple, les polymorphismes des gènes codant le transporteur membranaire de la

sérotonine (SERT) (Mattay *et al.*, 2003) ou le récepteur aux cannabinoïdes CB1 (Comings *et al.*, 1997; Ballon *et al.*, 2006), ont été associés avec la dépendance aux psychostimulants.

L'âge, l'impulsivité, le besoin de sensations nouvelles et fortes, la comorbidité avec d'autres troubles psychiatriques sont autant de facteurs intrinsèques au patient jouant également un rôle dans la propension à développer un trouble addictif.

Concernant les facteurs externes, on peut distinguer ceux liés à la drogue elle-même comme le type de drogue, le mode d'administration, la fréquence et la durée d'exposition à la substance, de ceux liés au contexte environnemental du patient comme une vie marginale, un manque de socialisation, un environnement familial défavorable ou la présence d'événements traumatisants survenus au cours de la vie de l'individu. Un facteur particulièrement important est le stress, qui souvent précipite la rechute mais qui peut aussi intervenir lors de l'installation de la pathologie. Un stress périnatal comme la séparation de la mère et de l'enfant après la naissance induit ainsi une augmentation de la consommation de drogue à l'âge adulte (Vazquez *et al.*, 2006).

B.3 Critères du diagnostic

Le diagnostic de dépendance repose sur les critères du DSM-V (Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th edition), [Tableau 1; (American Psychiatric Association, 2013)]. Il faut répondre à au moins deux critères sur une période de 12 mois pour satisfaire au diagnostic de dépendance. Le degré de sévérité est corrélé au nombre d'items positifs : 2-3 critères pour une dépendance dite légère, 4-5 critères pour un diagnostic modéré et 6 critères ou plus pour un diagnostic dit sévère.

Faisant initialement la part belle aux symptômes de tolérance et de sevrage, l'établissement du diagnostic de dépendance a évolué au fur et à mesure pour privilégier ceux basés sur une perte de contrôle de la consommation et l'usage compulsif. De fait, cette cinquième édition du DSM fait entrer le désir persistant, impérieux de consommer la substance, comme un critère à part entière.

Tableau 1 : Critères de la dépendance selon le DSM-V (American Psychiatric Association, 2013)

Utilisation inadaptée d'une substance conduisant à une altération du fonctionnement ou à une souffrance cliniquement significative, caractérisée par la présence de deux ou plus des manifestations suivantes, à un moment quelconque d'une période continue d'un an :

1. Usage récurrent de la substance ayant pour conséquence un retentissement majeur sur les activités quotidiennes (travail, scolarité ou vie de famille)
2. Usage récurrent de la substance dans des situations potentiellement dangereuses (conduite automobile ou utilisation de machines)
3. Usage continu de la substance malgré des problèmes interpersonnels ou sociaux récurrents ou persistants causés ou exacerbés par la substance
4. Tolérance, définie par l'un des symptômes suivants :
 - 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.
5. Sevrage, caractérisé par l'une ou l'autre des manifestations suivantes :
 - Syndrome de sevrage caractéristique de la substance
 - Consommation de la substance (ou d'une substance proche) pour soulager ou éviter les symptômes de sevrage.
6. La substance est souvent prise en quantité plus importante ou pendant une période plus longue que prévue.
7. Il y a un désir persistant ou des efforts infructueux pour diminuer ou contrôler l'utilisation de la substance.
8. Beaucoup de temps est passé à obtenir la substance, à consommer la substance, ou à récupérer de ses effets.
9. Des activités sociales, professionnelles ou de loisir sont abandonnées ou réduites à cause de l'utilisation de la substance.
10. 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.
11. Besoin irrépressible (« craving ») ou désir intense de consommer la substance

B.4 Théories de la dépendance

Malgré le fait qu'un certain nombre de facteurs de vulnérabilité connus (susceptibilité génétique, impulsivité, stress, environnement social défavorable, événements traumatisants...) prédisposent à l'installation d'une dépendance, on explique mal la mise en place de la perte du contrôle de la consommation chez certains usagers chroniques. Un certain nombre de théories ont été avancées pour expliquer cette transition progressive.

B.4.1 Renforcements positif et négatif

La cocaïne procure à l'usager des effets positifs et agréables. Pour cette raison, l'individu consommant de la drogue pour la première fois aura tendance à renouveler l'expérience (Wise, 1980). C'est le principe du renforcement positif qui est d'ailleurs utilisé chez l'animal dans le paradigme d'auto-administration (voir B.6.3), c'est-à-dire l'augmentation de la probabilité et la fréquence du comportement suite à la présentation du stimulus récompensant. Les expériences d'auto-stimulations intra-crâniennes initiées par Olds et Milner ont montré que les substrats neuroanatomiques du renforcement positif se situent autour du faisceau médian du télencéphale et plus particulièrement autour de la voie dopaminergique mésocorticolimbique (Olds et Milner, 1954; Wise, 1980; Wise et Bozarth, 1987).

Au contraire, la théorie du renforcement négatif, c'est-à-dire l'augmentation de la probabilité et la fréquence du comportement suite à l'absence du stimulus récompensant, développée par Georges Koob, s'appuie sur les effets déplaisants ressentis dans un second temps par l'usager à l'arrêt de la prise de drogue. Au fur et à mesure de la répétition des prises, une diminution des effets plaisants (tolérance) se met en place, rendant plus évidents les effets négatifs et désagréables dus au sevrage. Ce renforcement négatif induit par l'absence de drogue maintiendrait alors l'usage abusif de la substance (Koob et Bloom, 1988). Les structures cérébrales majoritairement responsables du renforcement négatif sont le noyau central de l'amygdale, la *substantia innominata* et les noyaux du lit de la strie terminale, formant ce qu'on appelle l'amygdale étendue (Koob et Le Moal, 1997, 2005).

B.4.2 Théorie de l'allostasie

S'appuyant sur les principes des renforcements positifs et négatifs, le modèle des processus opposants repose sur le fait que toute modification d'un état d'équilibre est contrée par des processus opposés visant à rétablir l'état basal (Solomon et Corbit, 1973). Ces processus opposés s'amplifieraient au fil des prises, réduisant ainsi le niveau hédonique du consommateur chronique. La théorie de la dérégulation homéostatique, aussi appelée allostasie (Koob et Le Moal, 1997), postule que, non seulement l'amplitude de l'effet positif ressenti diminue tandis que celle de l'effet négatif augmente, mais également que le niveau hédonique ne reviendrait plus au point homéostatique mais à un niveau inférieur nommé point allostatique. Ainsi, le consommateur chronique basculerait irrémédiablement vers un état anhédonique, le poussant à reprendre de la drogue pour retrouver un état homéostatique.

B.4.3 Apprentissage procédural

L'exposition répétée aux drogues induit dans les neurones du système de récompense des processus identiques à ceux observés lors d'un apprentissage. Ces neuroadaptations provoqueraient un apprentissage aberrant des stimuli associés à la consommation et constitueraient un pas dans la transition vers la dépendance (Hyman *et al.*, 2006). Ainsi, la consommation contrôlée deviendrait, petit à petit, un phénomène automatique, non conscient (Robbins et Everitt, 1999). Cette transition serait sous-tendue, au niveau anatomique, par un désengagement progressif des voies dopaminergiques ciblant le striatum ventral et la mise en jeu de plus en plus importante des projections aboutissant au striatum dorsal, renforçant ainsi les automatismes de consommation (Everitt et Robbins, 2005). De plus, l'exposition chronique aux drogues crée une altération du fonctionnement et de la structure des neurones du cortex préfrontal (CPF) (Volkow *et al.*, 1991, 1992; Robinson *et al.*, 2001) perturbant ainsi le contrôle exercé sur les systèmes dopaminergiques sous-corticaux (Jackson *et al.*, 2001; Meyer-Lindenberg *et al.*, 2002). Ce dérèglement du système cortical d'inhibition de l'action accentuerait l'apprentissage procédural aberrant résultant d'une consommation chronique de drogues.

B.4.4 Sensibilisation de la motivation

Selon cette théorie, on peut distinguer dans la consommation de drogue deux aspects impliquant des réseaux neuronaux distincts : la valeur hédonique, le « liking », dépendant des systèmes opioïde et endocannabinoïde du shell du noyau accumbens (NAc) et du pallidum ventral, et la valeur motivationnelle de la drogue, le « wanting », sous-tendue par le système dopaminergique provenant de l'aire tegmentale ventrale (ATV) (Berridge et Robinson, 1998; Berridge *et al.*, 2009). Au fur et à mesure de la répétition des prises, ce système dopaminergique se sensibilise, ce qui conduit à attribuer une valeur motivationnelle excessive aux stimuli environnementaux associés à la drogue, ainsi qu'à la drogue elle-même. Cette « incentive sensitization » serait à la base du besoin compulsif de consommer la substance (Robinson et Berridge, 2000). Le test de sensibilisation comportementale (voir B.6.1) refléterait cette augmentation de l'attractivité de la drogue au cours du temps. De même que dans la théorie de l'apprentissage procédural, le dysfonctionnement fronto-striatal contribuerait à l'exagération de la motivation de l'individu pour la substance.

Le phénomène de rechute serait relié à cette sensibilisation de la motivation de l'individu. En effet, autant chez l'homme que chez les rongeurs, on observe une augmentation de la recherche de

drogue induite par des indices environnementaux au cours des premières semaines de sevrage, précipitant ainsi la réinstallation d'un comportement compulsif (Gawin et Kleber, 1986; Grimm *et al.*, 2001; Pickens *et al.*, 2011).

Remarquons que chacune de ces théories n'explique qu'une des nombreuses facettes de la dépendance. Les théories du renforcement et de la dérégulation du niveau hédonique des individus mettent en avant ce qui se passe lors de l'usage abusif de drogue mais ne permettent pas d'expliquer le phénomène de rechute. La théorie développée par Everitt et Robbins est basée principalement sur un dysfonctionnement mnésique mais ne prend pas en compte l'attractivité de la drogue pour le consommateur, au contraire de la théorie de l'« incentive sensitization » qui décrit la dépendance comme une pathologie de la motivation surtout. Le fait qu'aucune théorie ne puisse prendre en compte l'ensemble des composantes de la pathologie illustre la complexité de ce trouble psychiatrique.

B.5 Approches thérapeutiques

Contrairement à la dépendance à d'autres drogues (nicotine, alcool, opiacés), aucun traitement pharmacologique n'est disponible pour soigner les patients dépendants aux psychostimulants de manière satisfaisante. Il n'existe pas de traitement de substitution comme dans le cas des opiacés (Mendelson et Mello, 1996), et les divers agents pharmacologiques testés dans le cadre d'essais cliniques ne montrent pas d'effets concluants (De Lima *et al.*, 2002). La prise en charge des patients à l'heure actuelle comprend, dans un premier temps, la réduction des troubles dus au sevrage (anxiété, troubles de l'humeur) à l'aide de benzodiazépines et/ou d'antidépresseurs, puis dans un second temps, un accompagnement psychologique qui prône l'abstinence.

De nouvelles approches thérapeutiques consistant à cibler la cocaïne elle-même, soit par le biais d'enzymes dégradant la molécule, soit par l'utilisation d'un vaccin anti-cocaïne sont en cours d'étude (Montoya, 2012). L'approche immunologique montre des résultats plus qu'encourageants chez l'animal. On observe une réduction de l'hyperactivité locomotrice et de la sensibilisation comportementale ainsi qu'une diminution de l'auto-administration de cocaïne et du comportement de recherche et de sa réinstallation (Koob *et al.*, 2011; Wee *et al.*, 2012). Cependant, les essais cliniques chez l'homme sont beaucoup moins probants et nécessitent d'être approfondis, en grande partie à cause de l'hétérogénéité de la réponse immunitaire des patients (Gorelick, 2012).

B.6 Modèle animal

Dans le but de modéliser au mieux les différents aspects de la pathologie, trois tests comportementaux sont couramment utilisés chez les rongeurs : mesure de l'activité locomotrice, test de préférence de place conditionnée et auto-administration intraveineuse de drogue. Basés sur un conditionnement pavlovien ou opérant, ces outils méthodologiques ont permis d'argumenter les différentes théories concernant la dépendance.

B.6.1 Activité locomotrice et sensibilisation comportementale

L'injection de cocaïne entraîne, de manière aiguë, une hyperlocomotion rapide et transitoire, facilement quantifiable, qui augmente au fur et à mesure du temps des injections quotidiennes (Reith, 1986). Ce phénomène, appelé sensibilisation comportementale, perdure pendant des mois suivant la dernière injection de cocaïne, ce qui permet d'étudier les mécanismes neurobiologiques s'établissant sur le long terme dans le cerveau (Kalivas *et al.*, 1988). Malgré le fait que l'hyperlocomotion induite par la cocaïne soit robuste, le phénomène de sensibilisation dépend du contexte avec lequel est associée l'injection, ce qui suggère l'importance de l'environnement et des apprentissages associatifs dans la dépendance (Post *et al.*, 1992).

Bien que cette sensibilisation psychomotrice soit souvent comparée à la sensibilisation de la motivation pour la drogue chez les individus dépendants, il faut considérer que cette augmentation de la locomotion ne fait que refléter une sensibilisation des circuits neuronaux dopaminergiques et n'est en rien une preuve directe de l'augmentation de la motivation pour la drogue (Robinson et Berridge, 2008).

B.6.2 Préférence de place conditionnée

Basé sur un conditionnement pavlovien où l'animal associe de manière passive un contexte X à la drogue et un contexte Y avec une injection de solution saline, le test de préférence de place conditionnée permet de mesurer à un instant donné la valeur relative qu'a attribué l'animal à chaque contexte suite à l'apprentissage. Ainsi, ce test reflète les propriétés appétitives ou aversives d'une substance, mais également la force de la trace mnésique engendrée suite à l'apprentissage (Sanchis-Segura et Spanagel, 2006).

Il faut cependant garder à l'esprit que, de même que dans le test de sensibilisation psychomotrice, le test de préférence de place conditionnée implique que les injections de drogue soient réalisées par l'expérimentateur. Ainsi, même si ces deux outils méthodologiques permettent de modéliser certains aspects de la dépendance, ils ne reflètent que très peu l'étiologie et le développement de la pathologie chez l'homme.

B.6.3 Auto-administration de cocaïne

Contrairement aux deux tests précédemment décrits, l'auto-administration (AA) intraveineuse de cocaïne est basée sur un conditionnement opérant. C'est donc le seul test permettant de modéliser la prise volontaire de drogue chez l'animal, se rapprochant ainsi au plus près de la consommation de substances toxicomanogènes chez l'homme. Il permet de mesurer les propriétés renforçantes de la cocaïne ; l'animal déclenchant lui-même les injections de cocaïne par l'appui sur un levier ou par l'introduction de son museau dans un orifice (« nose-poke » ou NP). En mesurant l'augmentation de ce comportement volontaire, on estime le renforcement induit par la drogue.

Depuis les travaux pionniers de Weeks et d'autres dans les années soixante (Weeks, 1961; Pickens et Thompson, 1968; Deneau *et al.*, 1969), de nombreux protocoles ont été mis au point afin de modéliser différents aspects et phases de la prise de drogue et de la dépendance.

Deux programmes différents de renforcement sont utilisés pour modéliser la phase de prise de drogue. Dans le programme de « fixed ratio » (FR), le nombre d'appuis sur le levier ou de NPs nécessaires à l'obtention d'une injection de drogue est fixe tout au long de la session d'AA. Lors d'une session d'AA avec un renforcement de type « progressive ratio » (PR), l'animal doit réaliser de plus en plus d'appuis ou de NPs pour obtenir l'injection suivante, en suivant une courbe exponentielle. Ainsi, le travail nécessaire pour obtenir la drogue augmente considérablement au fur et à mesure des injections successives (Hodos, 1961). Le protocole FR permet plutôt d'étudier l'acquisition et la maintenance d'un comportement de consommation de cocaïne alors que le protocole PR reflète la motivation de l'animal à consommer la substance (Caine *et al.*, 1993; Arnold et Roberts, 1997).

L'AA intraveineuse de drogue est également un excellent moyen pour modéliser le phénomène de rechute grâce au protocole de réinstallation du comportement de recherche après une période de sevrage ou d'extinction. La réinstallation est produite suite à l'exposition à un stress, à une injection de drogue ou aux indices environnementaux associés préalablement à l'auto-administration (Shaham *et al.*, 2003).

De nombreuses variantes au sein de ces protocoles permettent, en outre, de mieux cerner l'ensemble des propriétés addictives de la cocaïne en plus des seules propriétés renforçantes : perte du contrôle de la consommation, impulsivité, prise de la drogue malgré des conséquences néfastes. Ainsi, en modélisant certains items diagnostiques du DSM-V, donc la situation telle qu'on la retrouve chez l'homme, seuls 15 à 20 % des rats s'auto-administrant de la cocaïne sur plusieurs mois répondent à tous les critères modélisés (Deroche-Gamonet *et al.*, 2004; Vanderschuren et Everitt, 2004).

Il est clair qu'à travers tous ces protocoles, l'AA intraveineuse de drogue représente le test idéal pour modéliser la diversité et la complexité des différents aspects de la dépendance. De plus, un intérêt majeur réside dans la possibilité de pouvoir modifier directement le comportement de prise de drogue de l'animal de diverses manières, dont la voie pharmacologique comme dans les travaux exposés ici, et d'en étudier les conséquences afin de comprendre les mécanismes neurobiologiques à l'origine de la dépendance.

C - Neurobiologie cellulaire de la cocaïne

C.1 Mécanisme d'action

La cocaïne appartient à la classe pharmacologique des psychostimulants au même titre que les amphétamines et les cathinones ou encore la caféine et la nicotine. Les effets psychostimulants de la cocaïne sont dus à l'inhibition des transporteurs membranaires des monamines (dopamine, sérotonine et noradrénaline), permettant ainsi d'augmenter la concentration de ces neurotransmetteurs dans la fente synaptique (Ritz *et al.*, 1987; Amara et Kuhar, 1993; Ritz et Kuhar, 1993) (Figure 1). La cocaïne induit une forte augmentation de la dopamine extracellulaire dans le striatum, structure cible de la voie dopaminergique mésocorticolimbique, et ce, comme la quasi-totalité des drogues induisant une dépendance chez l'homme (Di Chiara et Imperato, 1988). Cette observation est à la base de l'hypothèse dopaminergique selon laquelle les propriétés renforçantes de la drogue seraient sous-tendues par la sur-activation de ce réseau neuronal (Wise et Bozarth, 1987; Bergman *et al.*, 1989; Kuhar *et al.*, 1991).

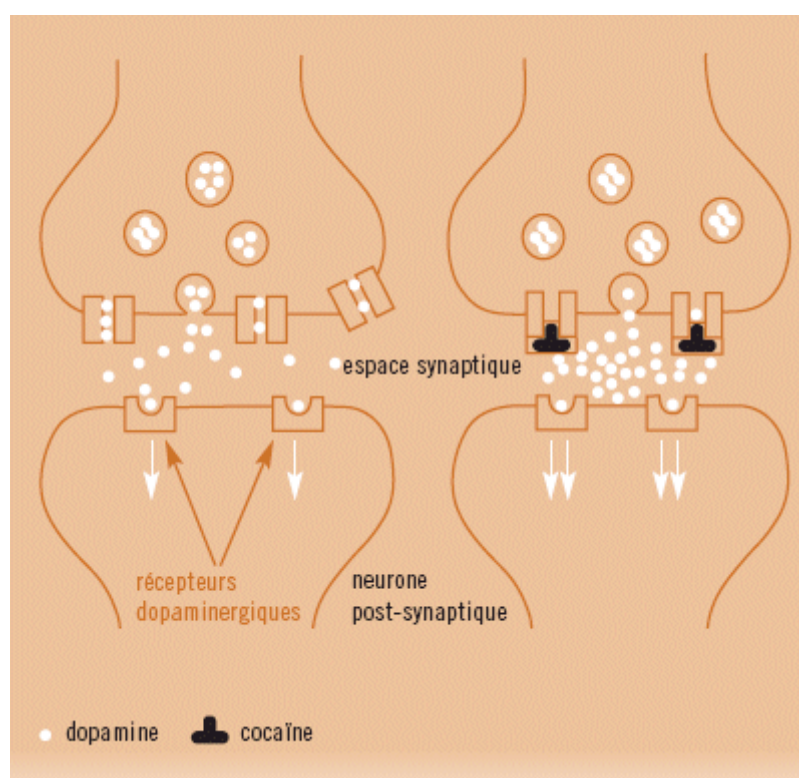


Figure 1 : Mécanisme d'action de la cocaïne au niveau de la synapse

En bloquant les transporteurs membranaires de la dopamine au niveau de l'élément présynaptique, la cocaïne entraîne une sur-activation des voies de signalisation cellulaire dépendantes des récepteurs dopaminergiques.

C.2 Le circuit de récompense

Décrit pour la première fois à partir d'expériences d'auto-stimulations électriques dans le cerveau de rats (Olds et Milner, 1954), le circuit dit « de récompense » regroupe différentes structures cérébrales organisées autour de la voie dopaminergique mésocorticolimbique issue de l'ATV et projetant majoritairement sur le CPF et le NAc [Figure 2 ; (Kauer et Malenka, 2007)]. Son rôle est de contribuer à la survie de l'organisme en participant à l'élaboration des comportements motivés dont le comportement alimentaire et sexuel.

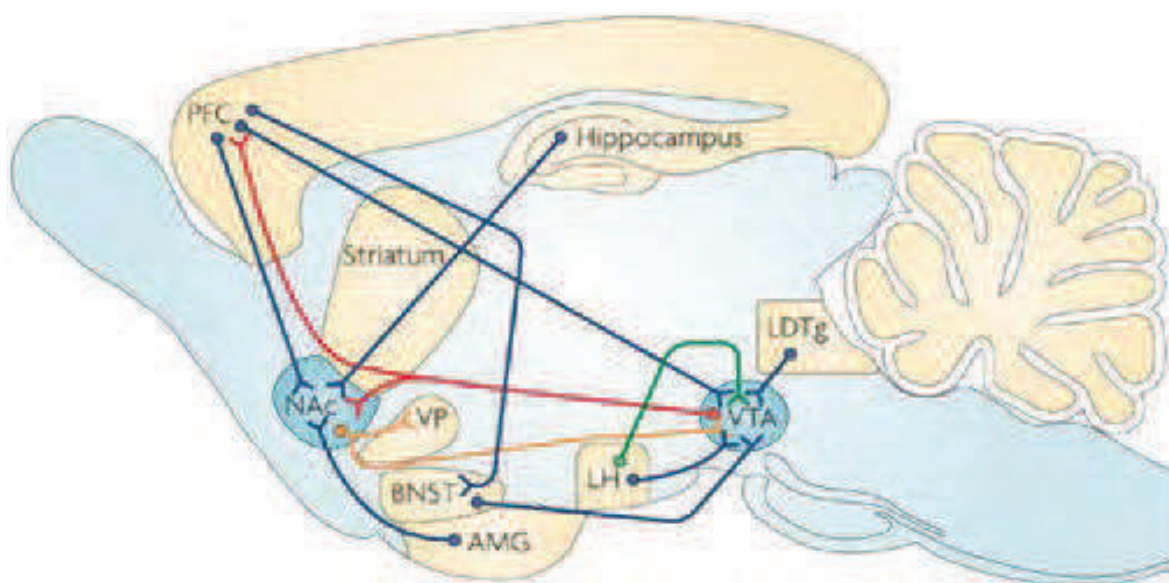


Figure 2 : Système dopaminergique mésocorticolimbique et afférences majeures sur l'ATV et le NAc chez le rat (Kauer et Malenka, 2007)

Les projections dopaminergiques sont représentées en rouge, glutamatergiques en bleu, GABAergiques en orange et orexinergiques en vert. AMG, amygdale; BNST, noyau du lit de la strie terminale; LDTg, noyau tegmental latérodorsal; LH, hypothalamus latéral; PFC, cortex préfrontal ; VP, pallidum ventral

Considéré comme un centre d'analyse et d'attribution d'une valeur motivationnelle aux stimuli environnementaux, le système de récompense joue un rôle prépondérant dans la réponse aux drogues (Berridge et Robinson, 1998). Les structures cibles des neurones dopaminergiques, le CPF et le NAc, sont impliquées dans diverses fonctions : prise de décision, inhibition ou initiation de l'action, activation sensori-motrice, processus mnésiques... Toutes ces fonctions permettent à ce système d'être au centre du déclenchement de l'action et d'organiser un comportement vers un but précis.

C.3 Système dopaminergique

C.3.1 Les projections du mésencéphale

Les neurones dopaminergiques sont regroupés en neuf noyaux distincts, nommés A8 à A16. Les noyaux mésencéphaliques A8 (noyau rétro-rubral), A9 (substance noire) et A10 (aire tegmentale ventrale) représentent environ 90 % des neurones dopaminergiques du SNC et constituent le point de départ de deux grandes voies (Andén *et al.*, 1965; Ungerstedt, 1971; Lindvall et Björklund, 1974) :

- La voie nigro-striée, dont les corps cellulaires se situent dans la *pars compacta* de la substance noire (SN), projetant vers le striatum dorsal.
- La voie mésocorticolimbique prenant son origine dans l'ATV et projetant majoritairement sur le cortex préfrontal médian (CPFm) et le shell du NAC, mais également sur l'amygdale, le septum, l'hippocampe et le pallidum ventral.

Cependant la démarcation entre les deux voies n'est pas très nette. La voie nigro-striée prend une partie de son origine dans l'ATV et le noyau rétro-rubral et projette également sur le striatum ventral (partie core du NAC). D'autre part, la voie mésocorticolimbique envoie aussi des projections sur le noyau caudé-putamen (CPu).

Ces projections dopaminergiques suivent en réalité un gradient allant de régions plutôt ventro-médianes à des régions plutôt dorso-latérales, formant par l'intermédiaire de projections réciproques avec les structures ciblées, une interconnexion en forme de spirale entre le striatum et les noyaux dopaminergiques du mésencéphale [Figure 3 ; (Haber, 2003)].

C.3.2 La synapse dopaminergique

Synthétisée au niveau des terminaisons axonales à partir de la tyrosine sous l'action de la tyrosine hydroxylase et de la L-DOPA décarboxylase, la dopamine (DA) est stockée dans des vésicules synaptiques par l'intermédiaire du transporteur vésiculaire des monamines, le VMAT2. Libérée par exocytose dans la fente synaptique lors de l'arrivée de potentiels d'action dans la terminaison présynaptique, elle agit en stimulant des récepteurs dopaminergiques pré et post-synaptiques. Elle est recapturée dans le neurone présynaptique par le transporteur de la dopamine, le DAT, puis à nouveau stockée dans les vésicules présynaptiques ou dégradée par l'action successive de la catéchol-O-méthyl-transférase (COMT) et des monoamine oxydases (MAO-A ou MAO-B).

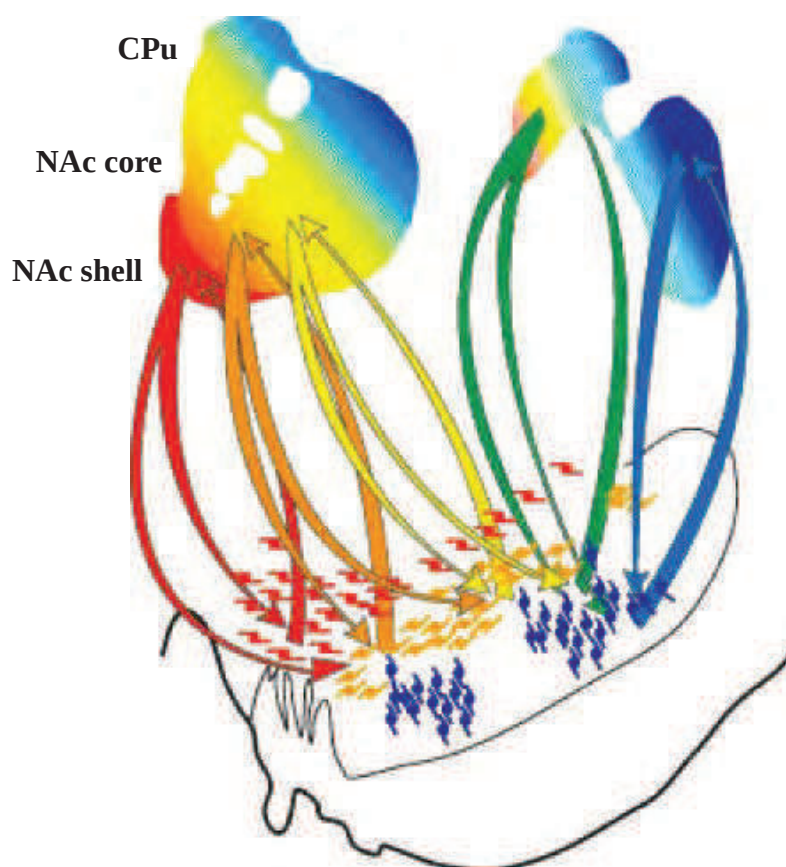


Figure 3 : Organisation des projections entre striatum et noyaux dopaminergiques du mésencéphale (Haber, 2003)

Les connexions réciproques entre le shell du NAc et l'ATV sont symbolisées par les flèches rouges. Les flèches orange indiquent les connexions entre le core du NAc et la partie médiane de la SN, les autres couleurs symbolisant le gradient de plus en plus dorso-latéral.

Il existe cinq types de récepteurs dopaminergiques, désignés D1 à D5, codés par des gènes distincts. Tous sont des récepteurs métabotropes couplés aux protéines G. On distingue deux familles selon la séquence génomique, la pharmacologie et le type de protéine G couplée :

- la famille D1 comprenant les récepteurs D1 et D5, majoritairement couplés à une protéine G_s qui active l'adénylate cyclase, conduisant ainsi à la production d'adénosine monophosphate 3',5' cyclique (AMPC) (Kebabian *et al.*, 1984). Dans certains cas, on les trouve couplés à une protéine G_q induisant la production d'inositol-trisphosphate par l'intermédiaire de la phospholipase C (Undie et Friedman, 1990). Les récepteurs de la famille D1 sont majoritairement localisés sur les membranes postsynaptiques.

- la famille D2 comprenant les récepteurs D2, D3 et D4 couplés à une protéine Gi/o inhibant l'adénylate cyclase donc diminuant la production d'AMPc (Cooper *et al.*, 1986). Contrairement aux gènes des récepteurs D1 et D5, les gènes codant les récepteurs de la famille D2 possèdent des introns et sont donc susceptibles de produire différents variants par épissage alternatif, comme les variants court et long du récepteur D2. Les récepteurs de la famille D2 se situent sur l'élément présynaptique comme sur le neurone postsynaptique.

On retrouve, dans le CPFm et le striatum, l'ensemble des différents récepteurs dopaminergiques, les sous-types D1 et D2 étant davantage exprimés et le récepteur D3 étant préférentiellement localisé dans le NAc (Money et Stanwood, 2013; Cahill *et al.*, 2014).

Le DAT est une protéine à douze segments transmembranaires appartenant à famille de transporteurs SLC6 (« solute carrier 6 »), comme le SERT (transporteur de la sérotonine) et le NET (transporteur de la noradrénaline). Comme tous les transporteurs de cette famille, le DAT utilise le gradient électrochimique de sodium et de chlore pour transporter la dopamine du milieu extracellulaire vers le cytosol. Ce transport couplé à celui du substrat est appelé symport, les ions sodium et chlorure transitant à travers la membrane plasmique dans la même direction [Figure 4 ; (Kristensen *et al.*, 2011)].

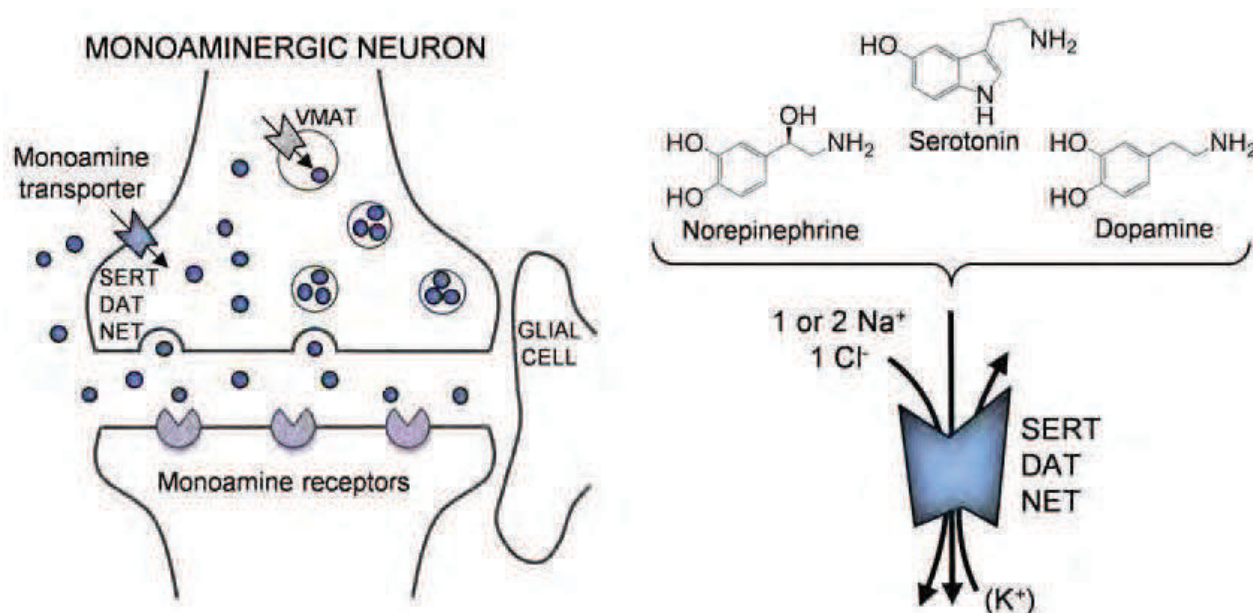


Figure 4 : Transport des monoamines (Kristensen *et al.*, 2011)

Les transporteurs vésiculaires des monoamines (VMAT) assurent le remplissage des vésicules de neurotransmetteurs alors que les transporteurs membranaires de la sérotonine (SERT), la dopamine (DAT) et la noradrénaline ou norépinéphrine (NET) permettent, grâce aux gradients de sodium et de chlore, la recapture des monoamines dans l'élément présynaptique.

C.3.3 Cocaïne et système dopaminergique

La cocaïne exerce son action psychostimulante en inhibant le DAT, bloquant ainsi la recapture de dopamine vers le cytosol et induisant une forte stimulation des récepteurs dopaminergiques.

Le pourcentage de transporteurs bloqués par la cocaïne est corrélé avec les effets ressentis par le consommateur. Ainsi, 47 % des DAT doivent être occupés par la cocaïne pour que le sujet ressente cette sensation intense d'euphorie appelée le « high » (Volkow *et al.*, 1997), ce qui est un argument supplémentaire en faveur de l'hypothèse dopaminergique. De plus, la génération de souris exprimant le DAT fonctionnel mais insensible à la cocaïne a révélé une absence d'hyperlocomotion et de préférence de place habituellement induite par la drogue (Chen *et al.*, 2006).

La cocaïne induit de nombreux changements morphologiques des neurones comme l'augmentation du nombre d'épines dendritiques et du branchement des dendrites dans les structures clés du système mésocorticolimbique que sont le NAc et le CPFm (Robinson et Kolb, 1999, 2004; Robinson *et al.*, 2001). Grâce aux souris exprimant le DAT fonctionnel et insensible à la cocaïne, on a montré que cette plasticité structurale dans le NAc était dépendante du système dopaminergique (Martin *et al.*, 2011).

Ainsi, il est aujourd'hui entendu que l'exacerbation du système dopaminergique par la cocaïne est largement à l'origine des effets renforçants de la drogue, mais participe également à des effets pouvant persister à long terme comme la plasticité cérébrale induite par la drogue.

C.4 Système sérotoninergique

C.4.1 Les voies sérotoninergiques

Localisés dans le mésencéphale, le pont et le bulbe rachidien, au sein des noyaux du raphé numérotés B1 à B9, les corps cellulaires des neurones sérotoninergiques projettent de manière diffuse sur l'ensemble du SNC (Andén *et al.*, 1965). Les voies descendantes issues des noyaux B1 à B4 innervent le tronc cérébral et la moelle épinière. Projetant sur le diencephale et le télencéphale, les voies ascendantes sont divisées en deux faisceaux issus des noyaux dorsal et médian du raphé. Ces deux grandes voies ascendantes innervent l'ensemble du cerveau antérieur dont les structures du système de récompense telles que les noyaux dopaminergiques du mésencéphale (SN et VTA), le CPF, le CPu et le NAc, le septum ou encore l'amygdale et l'hippocampe (Jacobs et Azmitia, 1992).

C.4.2 La synapse sérotoninergique

Synthétisée dans les terminaisons axonales à partir du L-tryptophane, sous l'action de deux enzymes (tryptophane hydroxylase et 5-hydroxytryptophane décarboxylase), la sérotonine (5-HT) est stockée dans les vésicules synaptiques tout comme la dopamine par l'intermédiaire du VMAT2. Suivant le même fonctionnement que la synapse dopaminergique (Figure 4), la 5-HT est libérée par exocytose pour stimuler des récepteurs sérotoninergiques pré et post-synaptiques, puis la majeure partie est recapturée par le SERT, et dégradée par la monoamine oxydase MAO-A.

Classés en fonction de la séquence des gènes et de leur analogie de structure et de transduction du signal intracellulaire, les récepteurs sérotoninergiques sont classés en sept familles désignées 5-HT1 à 5-HT7. Avec 14 membres au total sans compter les variants par épissage alternatif ou édition d'ARN, la famille des récepteurs sérotoninergiques est une des plus complexes parmi les différents systèmes de neurotransmission. A l'exception du récepteur 5-HT3 qui est un récepteur ionotrope, tous les membres des autres familles sont des récepteurs couplés aux protéines G : Gi/o pour les récepteurs 5-HT1 et 5-HT5, Gq pour les récepteurs 5-HT2 et Gs pour les familles 5-HT4, 5-HT6 et 5-HT7 (Hoyer *et al.*, 1994, 2002; Nichols et Nichols, 2008).

Comme le DAT, le SERT est une protéine à douze segments transmembranaires appartenant à la famille des transporteurs SLC6 et permettant, grâce au transport symport de sodium et de chlore, de recapturer la 5-HT dans le neurone pré-synaptique. En bloquant l'activité du SERT avec une très forte affinité, la cocaïne augmente la quantité de 5-HT dans la synapse et stimule un ensemble de récepteurs sérotoninergiques.

C.4.3 Cocaïne et système sérotoninergique

Bien que la majorité des effets renforçants et de la plasticité induite par la cocaïne semblent être sous-tendus par le système dopaminergique, un certain nombre d'études font état d'une forte interaction avec le système sérotoninergique. Les études de liaison de la cocaïne aux différents transporteurs des monoamines montrent une affinité similaire (de l'ordre de quelques centaines de nanomolaires) pour le SERT et le DAT (Koe, 1976; Ritz *et al.*, 1987; Rothman et Baumann, 2003; Han et Gu, 2006). On peut donc penser que le système sérotoninergique joue également un rôle prépondérant dans l'action de la cocaïne au niveau du SNC. En effet, l'administration chronique de cocaïne suivie ou non d'une période de sevrage provoque des changements neurochimiques et morphologiques au niveau des neurones sérotoninergiques dans des structures telles que la VTA, le NAc et le cortex frontal (Parsons et Justice, 1993; Horne *et al.*, 2008). De plus, en jouant sur le

système sérotoninergique, soit par invalidation du gène codant le SERT (Homberg *et al.*, 2008; Thomsen *et al.*, 2009), soit à l'aide d'agents pharmacologiques [pour revue (Filip *et al.*, 2010; Nonkes *et al.*, 2011)], de nombreux travaux montrent des modifications du comportement d'AA de cocaïne chez les rongeurs.

Enfin, des études de notre laboratoire démontrent un lien entre système sérotoninergique et modulation de l'expression génique induite par la prise de cocaïne :

- Augmentation de l'expression des récepteurs sérotoninergiques 5-HT3 et 5-HT2A suite à la prise chronique de drogue (Arpin-Bott *et al.*, 2006; Host *et al.*, 2010)
- Diminution à l'aide d'antagonistes des récepteurs 5-HT3 de l'expression de gènes précoces induite par la cocaïne (Humblot *et al.*, 1998)
- Mimétisme d'action de la fluoxétine, un inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine, sur la transcription de gènes précoces (Thiriet *et al.*, 1998) et de facteurs épigénétiques (Cassel *et al.*, 2006).

C.5 Autres systèmes de neurotransmission

La cocaïne module également la plupart des autres systèmes de neurotransmetteurs que ce soit de manière directe comme le système noradrénergique par l'inhibition du transporteur de la noradrénaline ou indirecte pour les systèmes glutamatergique, GABAergique, opioïde, endocannabinoïde et certains neuropeptides comme les orexines. Cependant, l'action de la cocaïne sur ces différents systèmes de neurotransmission ne sera pas abordée dans ces travaux.

Chapitre II : Méthylation de l'ADN dans le cerveau adulte

A - Les régulations épigénétiques

A.1 Définitions

C'est en 1957 que pour la première fois apparaît le terme « épigénétique ». Conrad Waddington l'utilise pour définir les relations génotype/phénotype, ou selon ses propres mots : « l'étude des relations de cause à effet entre les gènes et leurs produits, faisant apparaître le phénotype » (Waddington, 1957). Aujourd'hui, la notion d'épigénétique a considérablement évolué et désigne l'ensemble des modifications de la structure de la chromatine, transmissibles ou non, permettant de réguler l'expression des gènes en réponse à des stimuli intrinsèques et environnementaux (Jaenisch et Bird, 2003). Les modifications structurales de régions chromosomiques seraient alors un moyen de traduire ces stimuli et cette réponse des cellules serait enregistrée de manière plus ou moins stable, reconnaissable et transmissible (Bird, 2007). Cette définition inclut également les neurones post-mitotiques du cerveau mature dans lesquels l'état conformationnel de la chromatine rendrait compte de l'adaptation constante du cerveau et par-là même, de la cognition et du comportement des individus (Hong *et al.*, 2005; Siegmund *et al.*, 2007).

A.2 Dynamique de la chromatine

Les trois milliards de paires de bases du génome des mammifères ($2,75 \cdot 10^9$ pour le rat et $2,9 \cdot 10^9$ pour l'homme) mesureraient environ 2 m de longueur s'ils étaient étirés en un filament linéaire. Le degré de compaction de la double hélice d'ADN est tel que ce filament tient dans un noyau cellulaire d'un diamètre moyen de 6 μm .

L'unité fondamentale de cette organisation est le nucléosome formé d'un octamère d'histones autour duquel sont enroulées 147 paires de bases (Luger *et al.*, 1997). Cette formation, dite « en collier de perles » lorsqu'elle est visualisée en microscopie électronique, est condensée à l'aide de l'histone H1 pour former le nucléofilament d'un diamètre de 11 nm. La chromatine native se présente sous l'aspect d'une fibre de 30 nm de diamètre, la fibre chromosomique, résultant de l'enroulement du nucléofilament sous la forme d'un solénoïde (Finch et Klug, 1976). La formation

de boucles de chromatine à l'aide de protéines d'armature aboutit à l'élaboration du chromosome dont la forme la plus condensée est observée lors de la métaphase [Figure 5 ; (Brodeur et Toussaint, 2007)].

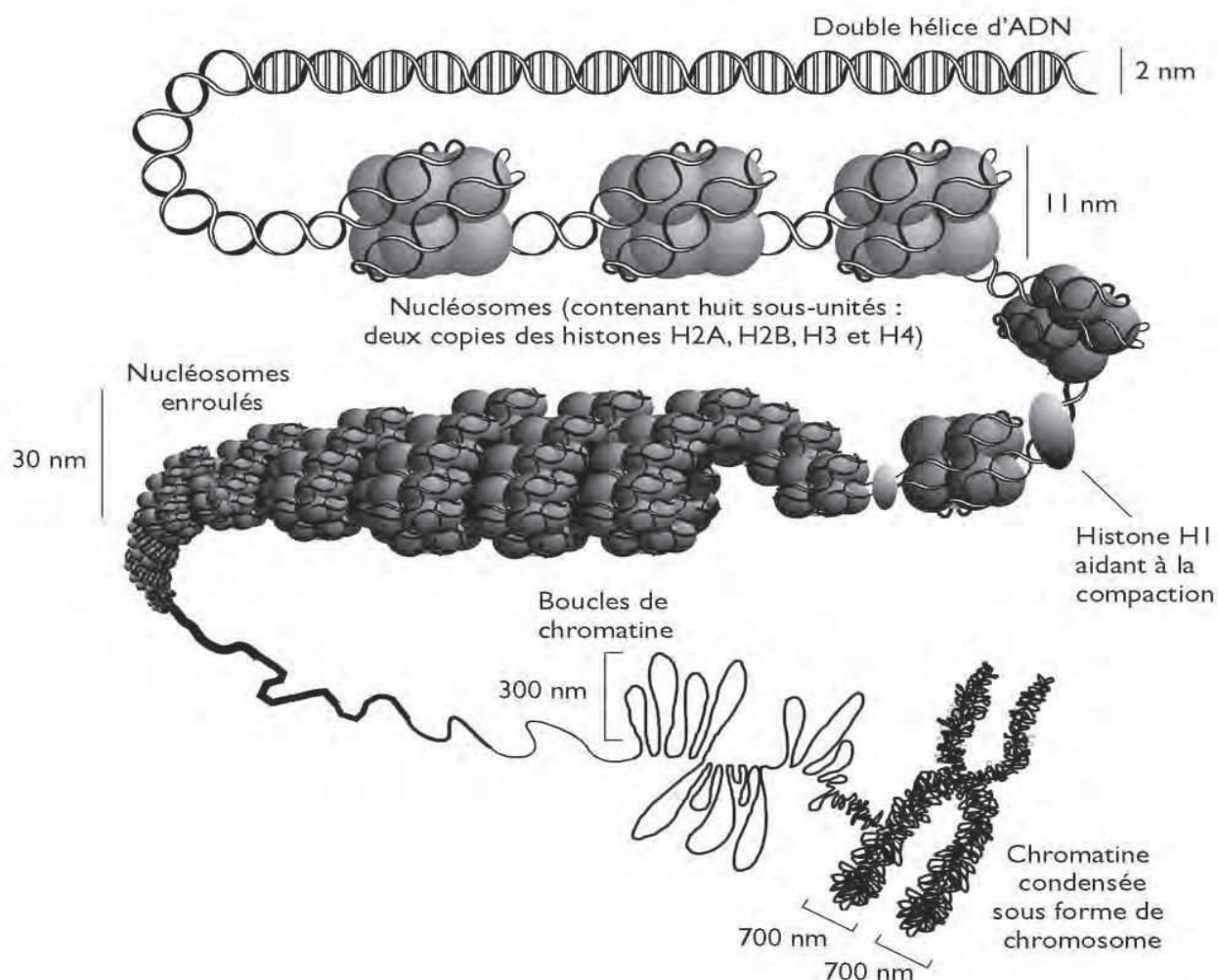


Figure 5 : Niveaux de compaction de la chromatine (Brodeur et Toussaint, 2007)

L'état de conformation de la chromatine détermine ainsi l'accessibilité aux facteurs de transcription, donc le degré d'expression des gènes. On distingue :

- l'euchromatine décondensée, généralement associée à une transcription active
- l'hétérochromatine facultative (séquences géniques réprimées) ou constitutive (séquences répétées, centromériques et télomériques), formes généralement associées à une transcription inactive.

Le degré de compaction de la chromatine dépend essentiellement de la structure et de la position des nucléosomes le long de la double hélice d'ADN et de modifications covalentes intervenant soit sur l'ADN soit sur les histones. L'ensemble de ces modifications altère directement la structure et la position du nucléosome et donc la conformation de la chromatine, que ce soit de manière physique en modifiant les interactions électriques entre l'ADN et les histones (Lee et Lee, 2012) ou par l'intermédiaire de facteurs décryptant ces marques épigénétiques (Pennings *et al.*, 2005; Suganuma et Workman, 2011). En coopération avec cet ensemble de marques covalentes, d'autres phénomènes (qui ne seront pas traités ici) contribuent également à la structure dynamique de la chromatine tels que l'action des complexes de remodelage de la chromatine dépendants de l'ATP ou l'incorporation de variants d'histones (Mueller-Planitz *et al.*, 2013), la participation de protéines dites « chaperonnes » des histones (Avvakumov *et al.*, 2011), ou encore les ARN non codants (Bernstein et Allis, 2005). En modifiant les interactions entre l'ADN et les histones, l'ensemble de ces processus crée une véritable dynamique des nucléosomes et constitue le fondement de la régulation de l'accès aux séquences codantes par les facteurs de transcription (Workman et Kingston, 1998; Choy et Lee, 2012).

B - Les modifications post-traductionnelles des histones

B.1 Un ensemble de combinaisons

L'extrémité N-terminale ou « queue » des histones est exposée à la surface des nucléosomes et se prête à de nombreuses modifications post-traductionnelles, comme l'acétylation des lysines, la phosphorylation des sérines et thréonines, la méthylation des lysines et arginines, l'ubiquitinylation ou sumoylation des lysines ou encore l'ADP-ribosylation, formant ce qui a été appelé le « code histones » (Strahl et Allis, 2000). Cependant, l'ensemble des combinaisons de ces marques covalentes, en association avec tous les autres processus épigénétiques, se révèle en réalité beaucoup plus complexe qu'un simple code. L'inter-dépendance des différentes modifications post-traductionnelles, la multitude de résidus concernés, la variabilité d'une même marque (*i.e.* mono-, di- ou tri-méthylation d'un même acide aminé), le grand nombre d'enzymes catalysant des réactions spécifiques d'une marque ou d'un résidu, l'existence de variants des histones H1, H2A, H2B et H3 ou encore la cohabitation de patterns activateurs et répresseurs de transcription au sein d'un même domaine ou de différents domaines N-terminaux du nucléosome (Fischle *et al.*, 2003), apportent une gigantesque diversité d'interprétation accentuée par l'hétérogénéité des facteurs protéiques décodant ces marques covalentes.

Ce travail de thèse portant essentiellement sur la méthylation de l'ADN, ne seront traités plus en détail que les aspects liés à l'acétylation des histones et aux enzymes qui régulent ce processus d'acétylation.

B.2 L'acétylation des histones

Le processus d'acétylation des histones [Figure 6 ; (Gong et Miller, 2013)] consiste en l'ajout d'un groupement acétyle issu de l'acétyl-coenzyme A sur la chaîne latérale des lysines de la queue des histones. Cette réaction permet de neutraliser la charge positive de la lysine et ainsi diminuer l'interaction avec l'ADN chargé négativement (Ausio et van Holde, 1986). L'histone acétylée permet le recrutement de complexes protéiques modifiant la structure et la dynamique du nucléosome. Ce processus entraîne le relâchement de la fibre de chromatine, qui devient plus accessible aux facteurs de transcription. Dès 1964, l'acétylation des histones a été associée à une augmentation de l'activité transcriptionnelle (Allfrey *et al.*, 1964). Deux familles d'enzymes régulent le niveau d'acétylation des histones : les histones acétyltransférases (HATs) qui ajoutent les groupements acétyles et les histones désacétylases (HDACs) qui les hydrolysent. On référence actuellement chez les mammifères 17 HATs et 18 HDACs (Gong et Miller, 2013).

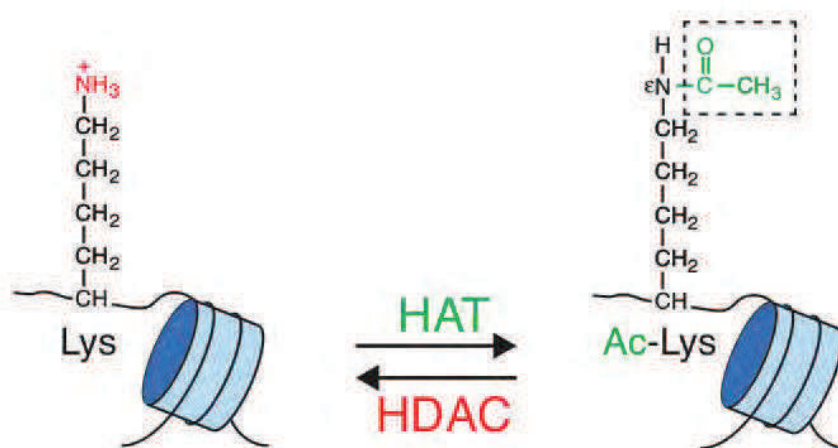


Figure 6 : Acétylation des histones (Gong et Miller, 2013)

B.2.1 Les histones acétyltransférases

Depuis le clonage de la première HAT chez les protozoaires *Tetrahymena* (Brownell *et al.*, 1996), de nombreuses HATs ont été découvertes, que ce soit chez des organismes comme la levure ou chez les mammifères. Les HATs sont classées en deux types d'après leur localisation et sous-

classées en différentes familles d'après leur homologie de séquence. Les HATs de type A sont nucléaires et acétylent les histones nucléosomales tandis que les HATs de type B sont cytoplasmiques et impliquées dans l'acétylation des histones néosynthétisées avant leur transport dans le noyau. La famille GNAT (« GCN5-related acetyltransferases ») est la mieux caractérisée et comprend, entre autres, les membres Gcn5 et PCAF (« p300/CBP associated factor ») mais également HAT1, une HAT cytoplasmique. La famille p300/ CBP comporte les deux co-activateurs de la transcription que sont p300 et CBP (« CREB-binding protein »). La famille MYST a été nommée d'après les membres qui la composent : MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2 et Tip60. Les deux autres familles de HATs sont la famille SRC (« steroid receptor coactivators ») et les HATs reliées aux facteurs de transcription TFII250 et TFIIC [pour revue (An, 2007; Marmorstein et Trievel, 2009)]. On peut encore ajouter à cet ensemble certains facteurs de transcription tels que CLOCK (« Circadian Locomotor Output Cycles Kaput »), un régulateur majeur des rythmes circadiens (Doi *et al.*, 2006).

B.2.2 Les histones désacétylases

On divise traditionnellement les 18 HDACs présentes chez les mammifères en quatre classes en fonction de leur homologie avec les HDACs de levure, leur localisation subcellulaire et leurs substrats [Tableau 2 ; (Lane et Chabner, 2009)].

Tableau 2 : Histones désacétylases (Lane et Chabner, 2009)

Class	Enzymes	Zn ²⁺ Dependent	Localization	Expression
I	HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8	Yes	Nucleus	Ubiquitous
IIa	HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9	Yes	Nucleus and cytoplasm	Tissue specific
IIb	HDAC6, HDAC10	Yes	Cytoplasm	Tissue specific
III	Sirtuins 1-7	No	Variable	Variable
IV	HDAC11	Yes	Nucleus and cytoplasm	Ubiquitous

Abbreviation: HDAC, histone deacetylase; Zn, zinc.

Les HDACs des classes I, II et IV contiennent un ion zinc dans leur site catalytique et sont inhibées par un ensemble d'inhibiteurs, tels que la trichostatine A. Les HDACs de la classe III ou sirtuines utilisent un mécanisme différent de désacétylation qui dépend du NAD (nicotinamide adénine dinucléotide) et ne sont pas inhibées par la trichostatine A ou les autres inhibiteurs généraux des HDACs.

De même que la plupart des HATs, les HDACs exercent leur activité catalytique sur des substrats autres que les histones, tels que les facteurs de transcription p53, NF- κ B ou STAT3, des récepteurs nucléaires comme ceux des androgènes ou des œstrogènes, des protéines du cytosquelette comme l' α -tubuline, ou encore des protéines chaperonnes (Glozak *et al.*, 2005).

Présentes dans l'ensemble du cerveau (Broide *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2013), les HDACs de classe I jouent un rôle important dans la plasticité synaptique et la mémoire (Kilgore *et al.*, 2010; Hawk *et al.*, 2011). En particulier, HDAC2 régule de manière négative la formation des synapses, la densité des épines dendritiques et la formation de traces mnésiques dans des tâches d'apprentissage associatif (Guan *et al.*, 2009; Morris *et al.*, 2013).

B.3 Histones acétyltransférases, histones désacétylases et cocaïne

Les enzymes régulant le niveau d'acétylation des histones jouent un rôle important dans le mode d'action des psychostimulants. En effet, suite à la prise de drogue, certaines HDACs voient leur expression modifiée. Par exemple, l'AA de cocaïne augmente fortement l'expression de HDAC2 dans le CPu, le NAc et le cortex préfrontal (Host *et al.*, 2011; Echeverry-Alzate *et al.*, 2014).

A l'inverse, par invalidation de gènes ou par l'utilisation d'inhibiteurs permettant de moduler l'activité pharmacologique de ces enzymes, de nombreuses modifications du comportement de prise de drogue ont pu être montrées chez l'animal. Par exemple, l'invalidation du gène *Clock* augmente la vulnérabilité à la cocaïne (McClung *et al.*, 2005; Ozburn *et al.*, 2012) alors que celle du gène codant la protéine CBP (« CREB-binding protein ») diminue les propriétés appétantes de la drogue (Malvaez *et al.*, 2011). L'inhibition des HDACs par la trichostatine A diminue la consommation et la motivation de l'animal pour la drogue dans un protocole d'AA de cocaïne, ainsi que la réinstallation du comportement d'AA après une période de sevrage (Romieu *et al.*, 2008, 2011). De récents travaux faisant appel à des inhibiteurs plus sélectifs tendent à impliquer particulièrement la classe I des HDACs dans la diminution des propriétés appétantes de la cocaïne (Kennedy *et al.*, 2013; Malvaez *et al.*, 2013).

C - La méthylation de l'ADN

C.1 De multiples rôles

Découverte il y a plus de soixante ans dans le génome des eucaryotes (Wyatt, 1951), la 5-méthylcytosine (5-mC) est considérée comme la cinquième base de l'ADN. Elle n'est cependant pas synthétisée comme un nucléotide à part entière mais résulte de l'ajout *in situ* d'un groupement méthyle (-CH₃) sur le carbone 5 d'une cytosine. Cette modification épigénétique a tout d'abord été étudiée lors du développement où on lui a attribué un rôle dans la régulation des gènes et la différenciation cellulaire (Holliday et Pugh, 1975; Riggs, 1975). On sait aujourd'hui qu'elle intervient dans divers processus physiologiques : embryogenèse, empreinte génomique parentale (processus concernant une centaine de gènes majoritairement impliqués dans le développement et par lequel une seule copie parentale du gène est exprimée), inactivation du chromosome X (mécanisme de répression au hasard d'un des deux chromosomes X chez la femelle), répression des séquences répétées représentant entre 45 et 65 % du génome chez l'homme (De Koning *et al.*, 2011), spécialisation cellulaire et tissulaire, dynamique du nucléosome et régulation de l'expression des gènes. Depuis les années 2000, un nombre croissant de publications font état de l'implication de la méthylation de l'ADN dans des processus intégrés au niveau du SNC : plasticité neuronale, neurogenèse, processus mnésiques.

C.2 A travers le génome

La méthylation de l'ADN a été initialement caractérisée chez les mammifères comme intervenant sur les cytosines lorsque celles-ci sont suivies d'une guanine c'est-à-dire dans un dinucléotide CpG. Il apparaît cependant que la 5-mC peut être suivie d'une autre base pendant le développement, principalement dans les cellules souches embryonnaires ainsi que dans les oocytes (Lister *et al.*, 2009; Ziller *et al.*, 2011). Plus récemment, il a même été suggéré que dans le cerveau adulte des mammifères, une proportion substantielle, allant jusqu'à 25 % dans le gyrus denté, de cytosines méthylées seraient suivies d'une adénine, d'une thymine ou d'une autre cytosine, et que cette méthylation serait reconnue de manière identique par les complexes répresseurs de la transcription contenant MeCP2 (Xie *et al.*, 2012; Lister *et al.*, 2013; Varley *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2014). Le rôle spécifique de ces dinucléotides non CpG n'est cependant pas connu à ce jour .

Les dinucléotides CpG sont sous-représentés à travers le génome des mammifères puisque l'on retrouve seulement 21 % de la fréquence attendue chez l'homme (Lander *et al.*, 2001). Ceci est dû à la désamination spontanée, ou enzymatique, de la 5-mC en thymine au cours du développement et de l'évolution (Coulondre *et al.*, 1978; Bird, 1980). Il faut noter que la désamination d'une cytosine non méthylée résulte en un résidu uracile qui est remplacé par les complexes de réparation de l'ADN. Le génome est cependant ponctué de régions courtes dont le contenu en GC et la fréquence des dinucléotides CpG sont largement supérieurs à l'ensemble de l'ADN. Ces îlots CpG représentent environ 5 % des dinucléotides CpG et 1 % du génome. Ils sont largement hypométhylés et on les retrouve souvent dans des promoteurs de gènes constitutivement exprimés (Vinson et Chatterjee, 2012). Si l'on se base sur la définition initiale d'un îlot CpG : longueur supérieure à 200 paires de bases, contenu en GC supérieur à 50 % et rapport CpG observés / CpG attendus supérieur à 0,6 (Gardiner-Garden et Frommer, 1987), on en dénombre environ 28000 à travers le génome humain (Lander *et al.*, 2001). Une étude plus récente a dénombré 24495 îlots CpG chez l'humain et 23021 chez la souris (Illingworth *et al.*, 2010). L'absence de méthylation, donc de transitions 5-mC → thymine, dans les lignées germinales pourraient être à l'origine de leur apparition au cours de l'évolution (Saxonov *et al.*, 2006; Smallwood *et al.*, 2011).

La moitié de ces îlots CpG contiennent un site d'initiation de la transcription (TSS) et font donc partie intégrante du promoteur des gènes. L'autre moitié est distribuée de manière équitable entre des régions intragéniques et intergéniques [Figure 7 ; (Deaton et Bird, 2011)]. Cependant, l'analyse de ces îlots CpG dits « orphelins » montrent qu'ils peuvent également être des sites d'initiation de la transcription et ainsi représenter des promoteurs alternatifs pour les gènes à proximité ou pour des ARN longs non codants (Illingworth *et al.*, 2010; Maunakea *et al.*, 2010; Deaton et Bird, 2011). Bien que la majorité des îlots CpG soient hypométhylés, on retrouve dans le cerveau humain 16 % d'îlots CpG méthylés, la grande majorité se trouvant dans des régions intragéniques et intergéniques. Seuls 3 % d'îlots CpG situés dans le promoteur 5' sont méthylés, alors que c'est le cas de 34 % des îlots à l'intérieur des gènes (Maunakea *et al.*, 2010). Sur 15302 îlots CpG analysés chez le rat, on retrouve le même profil avec une hypométhylation des promoteurs et une hyperméthylation des exons. Remarquablement, la méthylation est plus importante dans les séquences traduites comparées aux régions non traduites (UTR) ainsi que dans les régions permettant un épissage alternatif [Figure 8 ; (Sati *et al.*, 2012)].

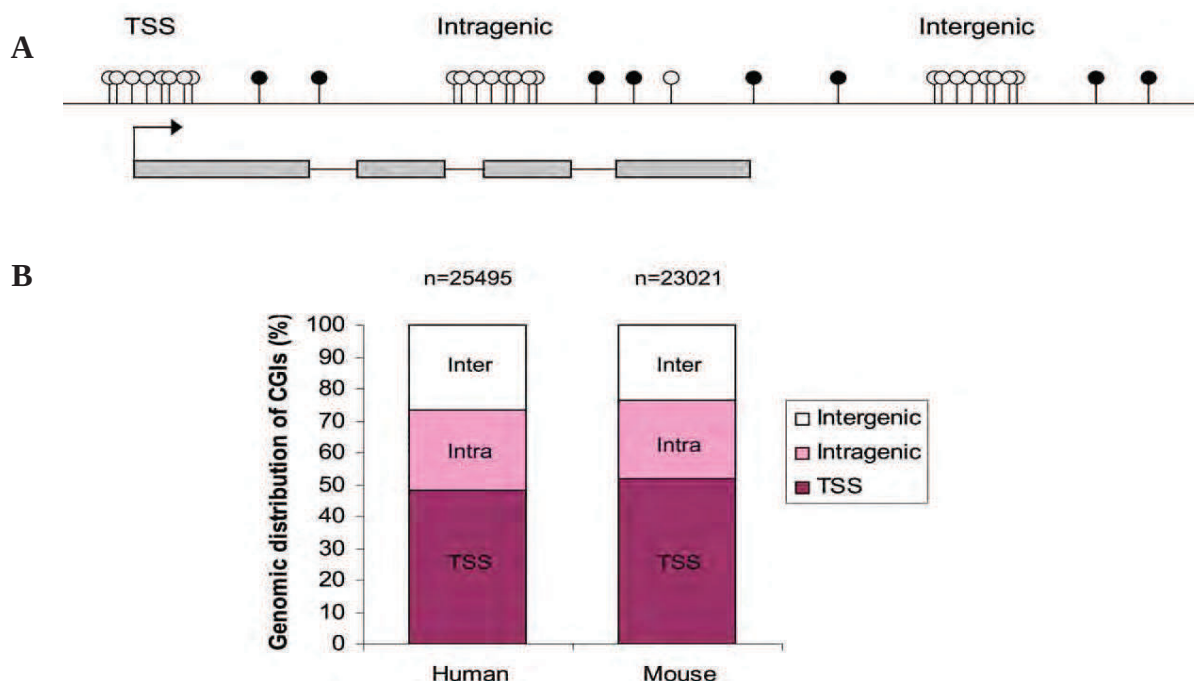


Figure 7 : Distribution génomique des îlots CpG (Deaton et Bird, 2011)

(A) Les îlots CpG (CGI) sont situés au niveau du site d'initiation de la transcription (TSS), à l'intérieur des gènes (« Intragenic »), ou entre les gènes (« Intergenic »). Les îlots CpG intragéniques et intergéniques sont classés comme orphelins car leur fonction reste méconnue à ce jour. Cercles vides : résidus CpG non méthylés ; Cercles pleins : résidus CpG méthylés. (B) Distribution génomique des îlots CpG chez l'homme et la souris d'après (Illingworth et al., 2010). Le nombre total d'îlots CpG est indiqué au-dessus de chaque graphique.

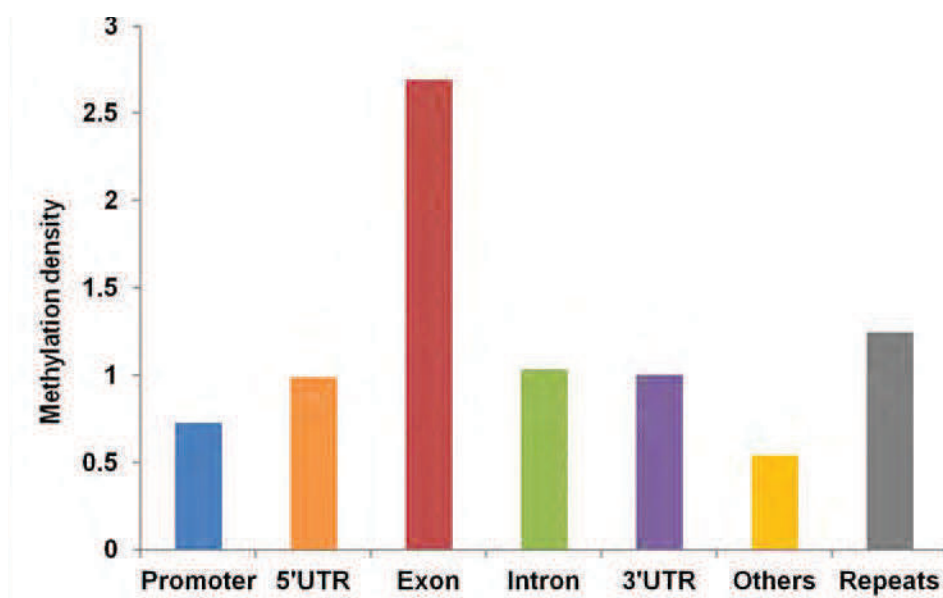


Figure 8 : Densité de méthylation chez le rat (Sati et al., 2012)

La densité de méthylation est calculée par rapport à la taille des régions. Ainsi, les régions répétées représentent en réalité 53,3 % de la méthylation totale.

C.3 Fonctions de la 5-méthylcytosine

C.3.1 Répression de la transcription

La méthylation de l'ADN est classiquement vue comme une marque répressive, inhibant la transcription du gène concerné. La méthylation de l'ADN réprime ainsi la transcription des gènes soumis à empreinte parentale (Li *et al.*, 1993), mais également des éléments transposables sur l'ensemble du génome, assurant de cette manière la stabilité des chromosomes (Yoder *et al.*, 1997; Martínez *et al.*, 2012), et joue également un rôle dans l'inactivation du chromosome X bien que sa nécessité soit remise en question (Basu et Zhang, 2011).

a) Mécanismes

D'une part, il est possible que la 5-mC bloque l'initiation de la transcription en empêchant la fixation des facteurs de transcription (Watt et Molloy, 1988). D'autre part, en altérant les interactions entre l'ADN et les histones, la méthylation des dinucléotides CpG affecte la formation, la structure, la position et la stabilité des nucléosomes, contribuant à la formation d'une conformation répressive de la chromatine (Pennings *et al.*, 2005; Choy *et al.*, 2010; Bettecken *et al.*, 2011; Lee et Lee, 2012; Portella *et al.*, 2013; Jimenez-Useche *et al.*, 2014). Dans une étude récente, la restauration d'une conformation permissive de la chromatine par un agent déméthylant tel que la 5-aza-2'-déoxycytidine (5-dAZA) a permis d'augmenter fortement l'expression du gène *H19*, un gène soumis à l'empreinte parentale (Ito *et al.*, 2013). Enfin, par l'intermédiaire des protéines de liaison à l'ADN méthylé qui recrutent des complexes répresseurs contenant des HDACs (voir C.9) et/ou des protéines de remodelage de la chromatine (Wade *et al.*, 1999; Feng et Zhang, 2001; N *et al.*, 2005), la méthylation de l'ADN accroît le niveau de condensation de la chromatine, induisant la répression de l'expression des gènes.

b) Promoteurs de gènes

Les promoteurs de gènes constitutivement exprimés contiennent un îlot CpG et sont très largement hypométhylés (Zhu *et al.*, 2008; Deaton et Bird, 2011). Concernant les gènes exprimés de façon tissu-spécifique, il semble que la corrélation méthylation/répression ne soit avérée que lorsque la densité de 5-mC est suffisamment importante dans les promoteurs riches en GC. Dans les promoteurs pauvres en GC, la méthylation des CpG n'empêche pas l'expression du gène concerné

(Weber *et al.*, 2007). La fonction de cette faible densité de méthylation serait alors de réduire le bruit de fond transcriptionnel (Bird, 1995). Cependant, une étude récente réalisée dans le CPF humain montre que le bruit de fond transcriptionnel général augmente avec la méthylation de l'ADN dans les promoteurs (Huh *et al.*, 2013). La fonction de la 5-mC dans les promoteurs pauvres en GC de gènes activement transcrits reste donc à ce jour inconnue.

c) Séquences régulatrices distales

Les séquences régulatrices distales sont des séquences possédant un rôle clé dans le contrôle de l'expression des gènes. Elles se situent en-dehors du promoteur proximal 5', dans les séquences intergéniques ou dans les introns. Des analyses du méthylome ont montré que ce sont des séquences pauvres en CpG dont le taux de méthylation est variable, suggérant une régulation dynamique de cette méthylation (Lister *et al.*, 2009; Schmidl *et al.*, 2009; Stadler *et al.*, 2011). La méthylation de ces séquences est intimement corrélée à leur fonction. Par exemple, la fixation du récepteur des glucocorticoïdes sur des séquences activatrices est corrélée à la déméthylation de ces séquences et à leur activation en présence du récepteur (Wiench *et al.*, 2011). Plus encore, l'analyse globale de la méthylation des séquences régulatrices distales a montré que, lorsqu'elles étaient liées à un gène et à un promoteur précis, la corrélation entre méthylation et répression du gène était plus forte pour ces séquences activatrices que pour le promoteur lui-même, et ce pour les $\frac{3}{4}$ des gènes concernés. Ainsi, la méthylation des séquences activatrices suffit à entraîner une diminution de l'expression du gène, même en absence de méthylation du promoteur (Aran et Hellman, 2013; Aran *et al.*, 2013). Même dans ces séquences régulatrices distales, la 5-mC a encore un rôle de répression de la transcription.

C.3.2 Le paradoxe de la méthylation de l'ADN

Il est connu depuis 30 ans que la méthylation intragénique est une caractéristique des gènes transcrits (Wolf *et al.*, 1984). D'une manière générale, les avancées techniques récentes, dont les approches couvrant la globalité du génome, ont confirmé que la méthylation est plus importante à l'intérieur des gènes que dans le promoteur et que cette méthylation est corrélée avec l'expression du gène, remettant partiellement en cause la vision traditionnelle de la méthylation de l'ADN comme marque répressive (Hellman et Chess, 2007; Lister *et al.*, 2009; Rauch *et al.*, 2009; Laurent *et al.*, 2010; Jjingo *et al.*, 2012; Sati *et al.*, 2012). Cette contradiction entre la conséquence de la méthylation dans les promoteurs par rapport aux corps des gènes est appelée « paradoxe de la méthylation de l'ADN » (Jones, 1999).

C.3.3 Méthylation intragénique

Différents rôles ont été attribués à la méthylation présente au sein même d'un gène. Initialement, il a été montré que la 5-mC réprimait les éléments répétés tels que les rétrotransposons LINE-1, Alu et autres présents dans les introns (Yoder *et al.*, 1997). De plus, les découvertes récentes concernant les promoteurs alternatifs présents dans les séquences intragéniques (voir C.2) montrent que ces promoteurs sont réprimés par méthylation (Maunakea *et al.*, 2010). La méthylation intragénique servirait alors à réprimer un ensemble de transcrits qui interfère avec l'expression du gène hôte (éléments transposables, ARN non codants ou antisens...) et ainsi diminuer le bruit de fond transcriptionnel (Flanagan et Wild, 2007). En effet, la méthylation intragénique est corrélée avec une diminution du bruit de fond transcriptionnel (Huh *et al.*, 2013). Ainsi, malgré une apparente activation de l'expression du gène hôte, la présence de 5-mC dans le corps du gène jouerait, au moins en partie, un rôle de répresseur de la transcription.

Cependant, certains arguments font penser que la répression de la transcription parasite ne serait qu'un épiphénomène (Jjingo *et al.*, 2012). En effet, la majorité de la méthylation intragénique est plutôt présente dans les régions transcrites que dans les introns (Laurent *et al.*, 2010; Jjingo *et al.*, 2012). De plus, la corrélation méthylation/expression n'est pas linéaire : les gènes comportant la méthylation intragénique la plus forte sont ceux qui sont modérément exprimés (Maunakea *et al.*, 2010; Jjingo *et al.*, 2012). Enfin, les gènes fortement exprimés voient la transcription de leurs promoteurs intragéniques augmenter, ce qui est en désaccord total avec le fait que la méthylation servirait à empêcher la transcription parasite afin de promouvoir l'expression du gène hôte (Jjingo *et al.*, 2012).

De nombreux arguments pointent un rôle majeur de la méthylation intragénique dans la régulation de l'épissage alternatif. D'une part, les exons sont très fortement méthylés par rapport aux introns mais l'on retrouve surtout une forte densité de méthylation aux jonctions entre les introns et les exons, suggérant un rôle important dans la reconnaissance des séquences codantes (Laurent *et al.*, 2010; Sati *et al.*, 2012). On ne retrouve d'ailleurs pas ce pattern dans les régions UTR alors que des événements d'épissage tels que l'« exon cassette » ou la rétention d'introns sont fortement marqués par la méthylation (Sati *et al.*, 2012). D'autre part, on retrouve préférentiellement la 5-mC sur l'ADN enroulé autour des nucléosomes, ceux-ci étant enrichis dans les exons et plus particulièrement aux jonctions introns/exons (Schwartz *et al.*, 2009; Chodavarapu *et al.*, 2010). Sachant que l'on observe également un enrichissement de l'ARN polymérase II dans les exons (Brodsky *et al.*, 2005; Chodavarapu *et al.*, 2010) et que l'épissage alternatif est dépendant de la

vitesse de transcription (Kornblihtt, 2007; Dujardin *et al.*, 2014), la fonction de la méthylation de l'ADN serait de ralentir l'ARN polymérase II, participant ainsi à un épissage alternatif plus fin et plus précis (Chodavarapu *et al.*, 2010; Sati *et al.*, 2012). Quelques exemples montrent ainsi que la présence de 5-mC dans les exons régule négativement la vitesse d'élongation de l'ARN polymérase II (Lorincz *et al.*, 2004; Veloso *et al.*, 2014) et influence directement l'inclusion/exclusion des exons lors de la transcription (Shukla *et al.*, 2011; Flores *et al.*, 2012).

En résumé, à l'inverse de la méthylation distribuée sur le reste du génome, il semble que la présence de 5-mC à l'intérieur des exons des gènes ait une fonction différente de la répression qui lui est classiquement associée ; alors que dans les introns, elle servirait à réprimer des séquences régulatrices distales ou des transcrits interférents.

C.4 Les ADN méthyltransférases

La méthylation de l'ADN chez les mammifères est catalysée par les ADN méthyltransférases ou DNMTs, la S-adénosyl-L-méthionine étant utilisée comme donneur de groupement méthyle (Smith *et al.*, 1992). On dénombre cinq DNMTs différentes (DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b, DNMT3l) mais seules les DNMTs 1, 3a et 3b ont une activité catalytique méthylant l'ADN.

La DNMT1 a été clonée pour la première fois en 1988 à partir de la souris (Bestor *et al.*, 1988). Elle est la DNMT la plus abondante chez les mammifères adultes (Feng et Fan, 2009). Du fait de sa préférence pour l'ADN hémiméthylé, elle est considérée comme assurant la méthylation de maintenance lors de la réplication de l'ADN (Pedrali-Noy et Weissbach, 1986; Kim *et al.*, 2002). La collaboration de la protéine UHRF1 (« Ubiquitin-Like With PHD And Ring Finger Domains 1 ») reconnaissant le brin d'ADN hémiméthylé et recrutant ensuite la DNMT1 est indispensable pour méthyler le brin d'ADN néosynthétisé et transmettre le pattern de méthylation lors de la mitose (Bostick *et al.*, 2007). L'inactivation des gènes codant la DNMT1 ou UHRF1 est létale dès le stade embryonnaire (Li *et al.*, 1992; Muto *et al.*, 2002).

Clonée en 1998 (Okano *et al.*, 1998a), la DNMT2 n'a qu'une faible activité de méthylation de l'ADN *in vitro*, malgré sa similarité de séquence avec les autres membres de la famille (Hermann *et al.*, 2003). *In vivo*, cette activité n'a jamais été détectée chez les mammifères (Schaefer et Lyko, 2010), mais elle permet de réprimer des rétrotransposons chez la drosophile et l'amibe *Dictyostelium discoideum* (Kuhlmann *et al.*, 2005; Phalke *et al.*, 2009). Chez les mammifères, la DNMT2 méthyle la cytosine 38 sur l'ARN de transfert pour l'acide aspartique (Goll *et al.*, 2006).

Cette activité d'ARN méthyltransférase pourrait s'étendre sur les cytosines 38 d'autres ARN de transferts (Schaefer et Lyko, 2010).

Les DNMTs 3a et 3b ont également été clonées en 1998 et caractérisées comme méthylant l'ADN *de novo*, c'est-à-dire catalysant la méthylation d'ADN non méthylé au préalable (Okano *et al.*, 1998b). Essentielles au développement et à la différenciation cellulaire, elles sont plus faiblement exprimées à l'âge adulte (Okano *et al.*, 1998b, 1999). L'inactivation du gène codant la DNMT3b est létale chez l'embryon alors que celle du gène codant la DNMT3a ne l'est que dans les semaines suivant la naissance, ce qui suggère un rôle plus important de la DNMT3b dans le développement précoce (Okano *et al.*, 1999). Bien que l'activité de méthylation *de novo* de la DNMT3a et de la DNMT3b se recoupe, elles ont également des rôles distincts. La DNMT3a est essentielle pour la méthylation des gènes soumis à l'empreinte parentale et la DNMT3b méthyle des séquences répétées péri-centromériques, assurant ainsi la stabilité des chromosomes (Xu *et al.*, 1999; Kaneda *et al.*, 2004). La mutation de la DNMT3b est responsable d'une maladie génétique récessive autosomale rare, le syndrome ICF (« Immunodeficiency, centromeric instability and facial anomalies syndrome ») où l'hypométhylation de l'ADN dans les séquences satellites péri-centromériques serait à l'origine d'une dérégulation de l'expression de gènes permettant le développement du système immunitaire (Hansen *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 1999; Ehrlich *et al.*, 2001; Jin *et al.*, 2008). Par ailleurs, on retrouve de manière récurrente des mutations de la DNMT3a dans certains types de cancers : les syndromes myélodysplasiques et les leucémies myéloïdes aiguës (Ley *et al.*, 2010; Walter *et al.*, 2011).

Le dernier membre de la famille des DNMTs, la DNMT3L, a été isolé en 2000 (Aapola *et al.*, 2000). Bien que possédant une forte homologie de séquence avec la DNMT3a et la DNMT3b, la DNMT3L ne possède pas les motifs nécessaires à l'activité catalytique propre aux autres DNMTs (Bourc'his *et al.*, 2001). Cependant, en se liant aux DNMTs 3a et 3b, elle stimule leur activité enzymatique (Suetake *et al.*, 2004; Gowher *et al.*, 2005) et joue un rôle important dans l'établissement de la méthylation des gènes soumis à empreinte parentale (Bourc'his *et al.*, 2001; Hata *et al.*, 2002).

Il faut noter que, bien que la DNMT1 soit considérée comme l'enzyme assurant la méthylation de maintenance et les DNMTs 3a et 3b comme les DNMTs *de novo*, leurs rôles se recoupe parfois. Ainsi, les trois enzymes coopèrent pour assurer la méthylation de maintenance dans les cellules en division (Rhee *et al.*, 2000, 2002; Kim *et al.*, 2002; Liang *et al.*, 2002). De même, dans le SNC adulte où les DNMTs 1, 3a et 3b sont toutes trois exprimées (Feng *et al.*, 2005; Simmons *et al.*,

2013), l'abondance de la DNMT1 dans des neurones post-mitotiques remet en question cette distinction entre méthylation de maintenance et méthylation *de novo*. De ce fait, la DNMT1 et la DNMT3a posséderaient des rôles redondants dans le cerveau (Feng *et al.*, 2010).

C.5 Les inhibiteurs des ADN méthyltransférases

A ce jour, un large panel de molécules ont montré une activité inhibitrice des DNMTs ou une activité de déméthylation de l'ADN [Figure 9 ; (Foulks *et al.*, 2012)]. On y retrouve des produits naturels comme des polyphénols tels que le curcumin, l'acide caféique, le (-)-épigallocatechin-3-gallate (EGCG) issu du thé vert ou encore la daidzéine issue du soja. Certains composés utilisés dans le domaine médical pour d'autres propriétés se sont avérés inhiber aussi les DNMTs comme la procaine, un anesthésique local plus connu sous le nom de Novocaïne®, ou encore l'hydralazine, un médicament luttant contre l'hypertension.

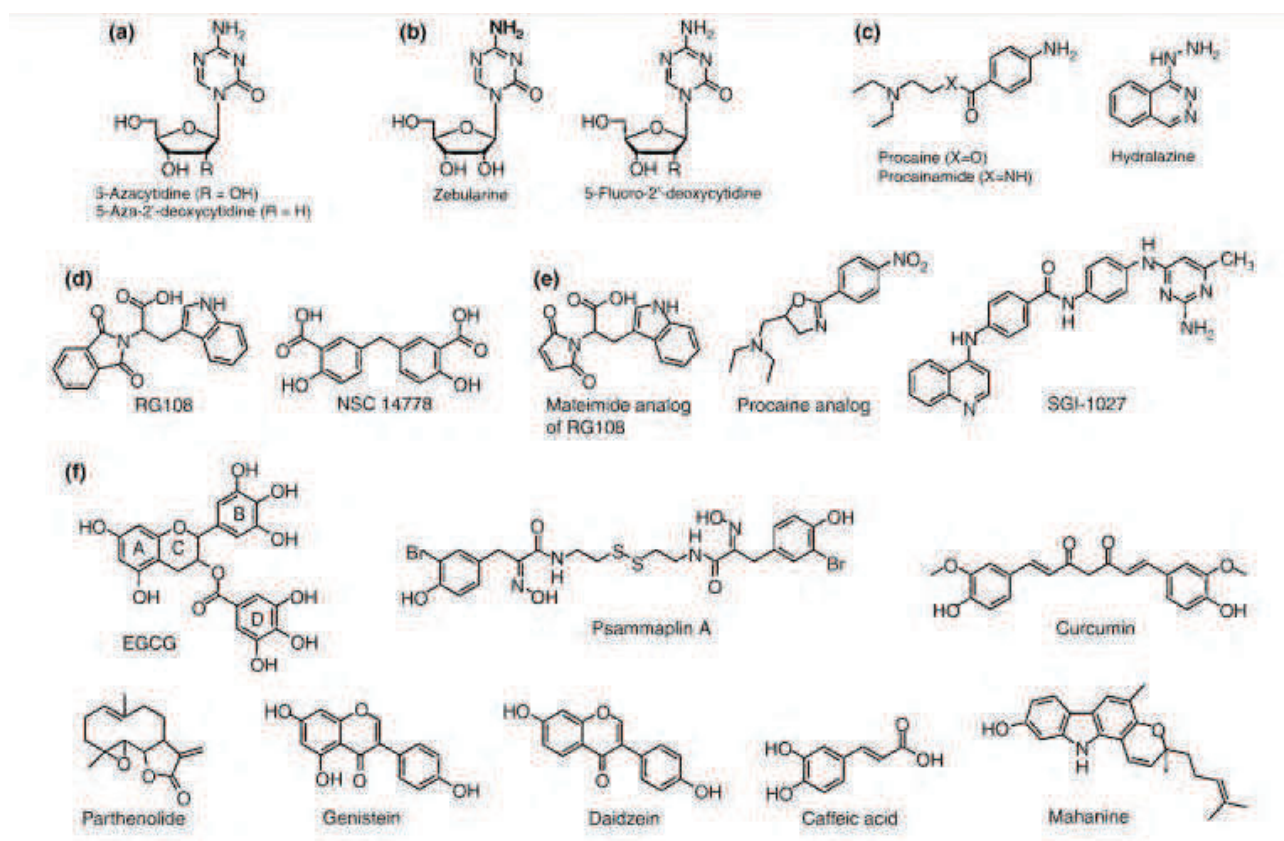


Figure 9 : Structure de divers composés inhibant les DNMTs (Foulks *et al.*, 2012)

(a) Analogues nucléosidiques approuvés dans le traitement des syndromes myélodysplasiques par la Food and Drug Administration. (b) Analogues nucléosidiques en développement clinique. (c) Médicaments utilisés dans d'autres pathologies. (d) Composés identifiés par « virtual screening ». (e) Composés synthétiques. (f) Produits naturels.

On divise habituellement les inhibiteurs des DNMTs en deux classes. La première comprend les analogues de nucléosides, comme la 5-dAZA et la zébularine, censés s'incorporer dans l'ADN et agir en tant qu'« inhibiteurs suicides » après formation de liaisons covalentes avec les DNMTs. La seconde classe regroupe des inhibiteurs non nucléosidiques agissant par un mécanisme d'inhibition classique.

Synthétisée en 1964 (Pliml et Sorm, 1964), la 5-dAZA est un analogue du nucléoside naturel, la 2'-désoxycytidine, dans lequel le carbone 5 est remplacé par un atome d'azote. Son activité anti-leucémique a été découverte dès 1968, mais il a fallu attendre 1981 pour le premier essai clinique (Sorm et Veselý, 1968; Rivard *et al.*, 1981). La 5-dAZA, commercialisée sous le nom de Dacogen®, est aujourd'hui utilisée dans le traitement des syndromes myélodysplasiques et des leucémies myéloïdes aiguës. La 5-dAZA entre dans les cellules par les transporteurs de nucléosides et passe également la barrière hémato-encéphalique (Karahoca et Momparler, 2013). Elle s'incorpore dans l'ADN et forme des liaisons covalentes irréversibles ADN-DNMTs (Juttermann *et al.*, 1994), ce qui induit, d'une part, la déméthylation et la réactivation des gènes suppresseurs de tumeurs hyperméthylés dans les néoplasies de la moelle, et d'autre part, un effet cytotoxique déclenchant l'apoptose (Karahoca et Momparler, 2013). La 5-dAZA est très instable en solution aqueuse à pH physiologique, cependant son produit de dégradation, la 2'-désoxyriboguanylurée, est aussi un puissant inhibiteur des DNMTs (Lamparska *et al.*, 2012).

Synthétisée pour la première fois en 1961, la zébularine a tout d'abord été caractérisée comme un inhibiteur de la cytidine désaminase, une enzyme de la voie secondaire de synthèse des pyrimidines (Kim *et al.*, 1986). Caractérisée ensuite comme inhibiteur des DNMTs et agent déméthylant susceptible de réactiver les gènes réduits au silence (Hurd *et al.*, 1999; Cheng *et al.*, 2003), elle est aujourd'hui en phase d'essai clinique en tant que traitement anti-cancéreux. Contrairement à la 5-dAZA, la zébularine forme des complexes covalents ADN-DNMTs réversibles, ce qui est sans doute à l'origine de sa moindre toxicité (Champion *et al.*, 2010). Cependant son pouvoir déméthylant est également plus faible, sans doute en raison de l'inhibition simultanée de la cytidine désaminase (Yoo *et al.*, 2004; Flotho *et al.*, 2009).

Il faut noter que la question du mécanisme d'inhibition de la 5-dAZA et la zébularine dans les neurones post-mitotiques du cerveau mature se pose. À moins qu'un système de réparation de l'ADN particulièrement actif n'incorpore dans l'ADN les inhibiteurs nucléosidiques, il faut postuler un autre mode d'action pour ces agents. En effet, en l'absence de réplication de l'ADN et sans la formation d'intermédiaires covalents entre l'enzyme et l'inhibiteur, la 5-dAZA entraîne la

dégradation de la DNMT1 par la voie du protéasome (Ghoshal *et al.*, 2005; Datta *et al.*, 2012). D'autres études montrent que l'injection de 5-dAZA et de zébularine dans des structures cérébrales ou dans l'ensemble du SNC déméthyle directement l'ADN (Levenson *et al.*, 2006; Miller et Sweatt, 2007; Anier *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2010). De plus, l'injection de 5-dAZA ou de zébularine semble induire des effets comportementaux similaires à celle d'inhibiteurs non nucléosidiques (Miller *et al.*, 2010). Cependant, à ce jour, aucune étude n'a encore caractérisé le mode d'action des inhibiteurs nucléosidiques des DNMTs dans le cerveau adulte.

C.6 La méthylation : un processus dynamique

Le fait que la méthylation de l'ADN réprime de manière continue et à long-terme les éléments répétés et les gènes soumis à empreinte parentale, ajouté au phénomène de transmission de ce pattern lors de la division cellulaire mais également à la descendance (Wigler, 1981; Holliday, 1987; Jablonka et Lamb, 1989), a longtemps laissé penser que la méthylation de l'ADN était une modification particulièrement stable. Cependant, bien que l'ADN puisse être déméthylé de manière passive et progressive lors de mitoses successives, on ne peut expliquer les vagues de déméthylation massives et rapides survenant dans les cellules germinales primaires (les futurs gamètes) ainsi que dans le pronucleus mâle après la fertilisation (Monk *et al.*, 1987; Howlett et Reik, 1991; Kafri *et al.*, 1992). Ces phénomènes ont suggéré l'existence de mécanismes de déméthylation active. Ainsi, dès 1993, on a pu montrer que des extraits nucléaires d'embryons de poulets induisaient la déméthylation active de l'ADN en faisant intervenir les systèmes de réparation de l'ADN pour exciser la 5-mC (Jost, 1993; Jost et Jost, 1995). De nombreuses voies de déméthylation active ont depuis été proposées (Wu et Zhang, 2010) : excision directe du groupement méthyle par la MBD2 (Bhattacharya *et al.*, 1999), excision de la 5-mC par des ADN glycosylases comme MBD4 ou la thymine ADN glycosylase (TDG) (Jost *et al.*, 1995; Zhu *et al.*, 2000a, 2000b), excision du nucléotide contenant la 5-mC par la protéine Gadd45 (Barreto *et al.*, 2007), désamination de la 5-mC en thymine par les cytidine désaminases de la famille AID/APOBEC (Morgan *et al.*, 2004; Popp *et al.*, 2010) ou les DNMTs elles-mêmes (Kangaspeska *et al.*, 2008; Métivier *et al.*, 2008), ou encore oxydation de la 5-mC en 5-hydroxyméthylcytosine (5-hmC) puis 5-formylcytosine (5-fC) et 5-carboxylcytosine (5-CaC) par les protéines de la famille « ten-eleven-translocation » (TET) (Tahiliani *et al.*, 2009; Ito *et al.*, 2011). Les données contradictoires concernant l'excision directe du groupement méthyle, de la 5-mC ou de la cytidine méthylée (Wu et Zhang, 2010) et la voie de désamination de la 5-mC en thymine (Nabel *et al.*, 2012), ajoutées au fait que la 5-hmC est présente en très grande quantité dans certains tissus, en particulier le cerveau (Kriaucionis et Heintz, 2009;

Tahiliani *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2011b; Ito *et al.*, 2011), permettent de privilégier aujourd'hui l'oxydation de la 5-mC en tant que voie majeure de déméthylation active [Figure 10 ; (Kohli et Zhang, 2013)]. Catalysée par les TETs 1, 2 et 3, l'oxydation de la 5-mC serait suivie soit d'une déhydroxyméthylation par les DNMTs (Liutkevičiūtė *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2012), soit d'une désamination par les AID/APOBEC (Guo *et al.*, 2011b) bien que cela soit controversé (Nabel *et al.*, 2012), soit d'une excision de base par la TDG puis une réparation des sites abasiques par le complexe « base excision repair » (BER) (He *et al.*, 2011; Dalton et Bellacosa, 2012).

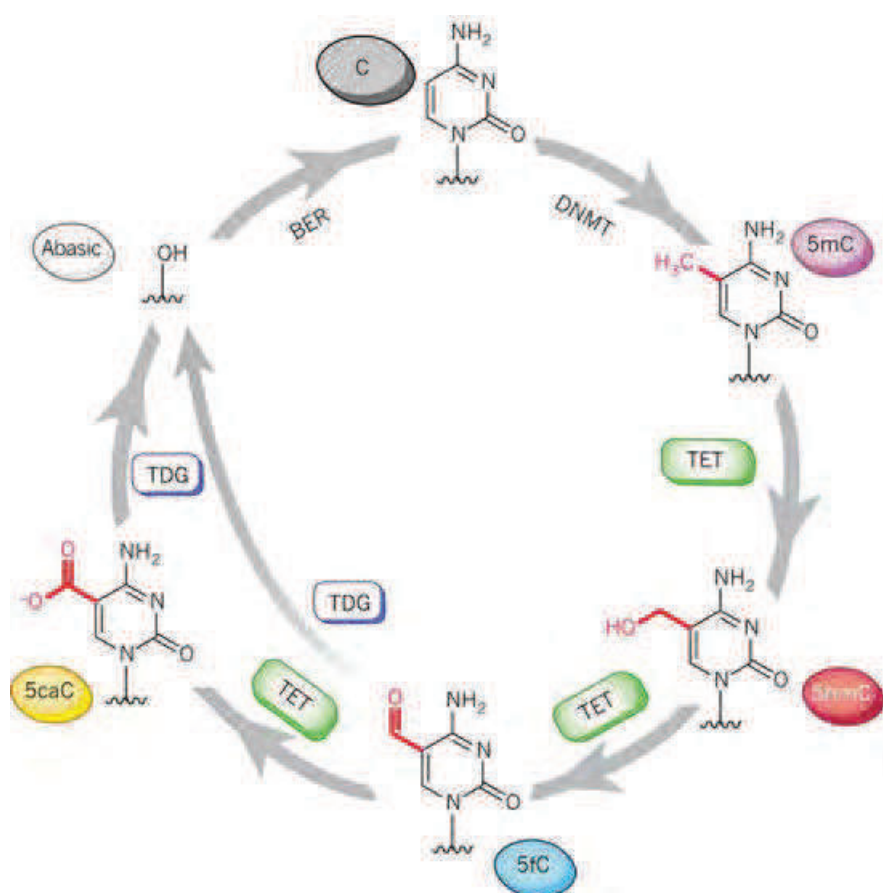


Figure 10 : Voie de déméthylation active par les TETs (Kohli et Zhang, 2013)

Bien que sa présence ait été rapportée depuis des décennies chez les bactéries (Wyatt et Cohen, 1953) et chez les mammifères (Penn *et al.*, 1972), la 5-hmC a été « redécouverte » en 2009 (Kriaucionis et Heintz, 2009; Tahiliani *et al.*, 2009). Le cerveau est le tissu le plus riche en 5-hmC (Li et Liu, 2011) et son enrichissement dans les régions intragéniques est corrélé à une augmentation de l'expression des gènes (Jin *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2011). La 5-hmC est particulièrement enrichie et régulée dans les gènes possédant une fonction synaptique (Szulwach *et*

al., 2011; Khare *et al.*, 2012; Massart *et al.*, 2014), ce qui suggère qu'elle serait une marque épigénétique impliquée dans le fonctionnement cérébral et non un simple intermédiaire dans le processus de déméthylation. Ceci est attesté par le fait que la 5-mC et la 5-hmC sont, en partie, localisées dans des régions distinctes du génome (Szulwach et Jin, 2014), mais également par l'existence de facteurs se liant à la 5-hmC tels que MeCP2 (Mellén *et al.*, 2012; Spruijt *et al.*, 2013).

C.7 Méthylation et plasticité neuronale

L'essor de l'épigénétique dans le domaine des neurosciences a permis d'établir que la méthylation de l'ADN jouait un rôle important dans la plasticité synaptique et les fonctions mnésiques. La méthylation de l'ADN est régulée de manière particulièrement dynamique dans les gènes dont on sait qu'ils participent de manière prépondérante à la plasticité neuronale et au fonctionnement des synapses (voir C.6).

La 5-mC intervient par ailleurs directement dans le fonctionnement de la synapse au niveau de la transmission de l'information, que ce soit de manière basale ou lors de l'encodage de stimuli spécifiques. Ainsi, l'inhibition des DNMTs affecte l'excitabilité neuronale et l'activité générale des réseaux neuronaux en diminuant la fréquence des potentiels post-synaptiques excitateurs miniatures (Nelson *et al.*, 2008). La méthylation de l'ADN semble aussi jouer un rôle dans les phénomènes de plasticité synaptique à long-terme. En effet, la zébularine comme la 5-dAZA empêchent l'induction de la potentialisation à long-terme des synapses excitatrices dans l'hippocampe (Levenson *et al.*, 2006; Miller *et al.*, 2008), de la même manière que la double invalidation des gènes *Dnmt1* et *Dnmt3a* dans les neurones excitateurs du cerveau antérieur (Feng *et al.*, 2010). Ce déficit de plasticité synaptique chez des souris n'exprimant ni la DNMT1, ni la DNMT3a est corrélé à un déficit d'apprentissage dans une tâche de mémoire spatiale (Feng *et al.*, 2010). Les inhibiteurs de DNMTs entraînent également un déficit mnésique dans des tâches d'apprentissage associatif, comme le conditionnement de peur au contexte, qu'ils soient injectés dans l'hippocampe immédiatement après l'apprentissage (Miller et Sweatt, 2007; Miller *et al.*, 2008) ou dans le cortex préfrontal les jours précédant le rappel de la tâche (Miller *et al.*, 2010). Ces données suggèrent que la méthylation de l'ADN joue un rôle majeur dans la consolidation, le maintien et le rappel d'une mémoire à long-terme (Day et Sweatt, 2011). La méthylation de l'ADN a également une fonction indispensable dans des tâches d'apprentissages associatifs impliquant une récompense. En effet, l'inhibition des DNMTs dans l'ATV, structure clé du système de récompense, empêche l'acquisition du conditionnement (Day *et al.*, 2013).

C.8 Implications dans les pathologies

La méthylation de l'ADN participe au développement de nombreuses pathologies (Robertson, 2005) : cancers, syndromes liés à l'empreinte génomique parentale comme les syndromes de Prader-Willi et d'Angelman, pathologies du système immunitaire tels que le lupus érythémateux ou le syndrome ICF causé par la mutation du gène codant la DNMT3b, désordres métaboliques comme le diabète. Dans le cas des cancers, on observe fréquemment une hypométhylation globale de l'ADN rendant le génome instable, ainsi qu'une hyperméthylation locale associée à la répression des gènes suppresseurs de tumeurs. Plusieurs théories s'affrontent toujours quant à la cancérogenèse, il est cependant de plus en plus admis que des altérations épigénétiques, en étroite association avec l'apparition de mutations et de réarrangements chromosomiques, sont à l'origine de nombre de tumeurs cancéreuses (You et Jones, 2012).

Concernant les troubles neurologiques, la méthylation de l'ADN est impliquée dans certains types de retards mentaux tels que le syndrome de Rett associé à une mutation de MeCP2 ou le syndrome du X fragile dû à une expansion et une hyperméthylation du triplet de nucléotides CGG en 5' du gène *Fmr1*, mais aussi dans des pathologies psychiatriques telles que la schizophrénie et les troubles bipolaires où l'on retrouve fréquemment des gènes différenciellement méthylés et exprimés tels que ceux codant le SERT, la reeline ou la glutamate décarboxylase 67 (GAD67) (Grayson et Guidotti, 2013; Kato et Iwamoto, 2014).

C.9 Méthylation de l'ADN et acétylation des histones

Les premiers mécanismes établissant une interaction entre l'acétylation des histones et la méthylation de l'ADN font appel aux protéines de liaison à l'ADN méthylé. MeCP2 (« methyl-CpG-binding protein 2 ») est une protéine monomérique possédant un domaine de liaison à l'ADN méthylé, se liant aux dinucléotides CpG méthylés, plus particulièrement lorsque ceux-ci sont entourés de séquences riches en A/T (adénine/thymine) (Lewis *et al.*, 1992; Nan *et al.*, 1993; Klose *et al.*, 2005). MeCP2 possède également un domaine TRD (« transcriptional repressor domain ») permettant le recrutement de complexes protéiques répresseurs de la transcription comprenant HDAC1 ou HDAC2 (Nan *et al.*, 1997, 1998; Jones *et al.*, 1998). De plus, la protéine MeCP2 elle-même peut être acétylée par la HAT p300 et désacétylée par SIRT1, une HDAC de classe III (Zocchi et Sassone-Corsi, 2012). La protéine MBD2 (« methyl-CpG-binding domain protein 2») recrute le complexe répresseur NuRD, comprenant HDAC1, à l'ADN méthylé (Ng *et al.*, 1999). Une autre interaction connue entre HDACs et MBDs concerne MBD1 et HDAC3 associées dans un

même complexe répresseur (Villa *et al.*, 2006; Hameed *et al.*, 2014). Les HDAC 1 et 2 peuvent également s'assembler directement avec les enzymes responsables de la méthylation de l'ADN, les DNMTs pour former des complexes répresseurs de la transcription (Fuks *et al.*, 2001; Geiman *et al.*, 2004).

Enfin, l'utilisation d'inhibiteurs des HDACs et des DNMTs a permis de démontrer l'interaction entre le niveau d'acétylation des histones et de méthylation de l'ADN. Ainsi, le valproate, un inhibiteur des HDACs, induit une diminution du niveau d'acétylation des histones mais aussi une déméthylation de l'ADN, en particulier au niveau du promoteur de gènes connus pour être régulés par la méthylation tels que ceux codant la reeline et la glutamate décarboxylase 67 (GAD67) (Detich *et al.*, 2003; Mitchell *et al.*, 2005; Dong *et al.*, 2007, 2008; Kundakovic *et al.*, 2009). A l'inverse, la 5-dAZA déméthyle les CpG méthylés mais entraîne également une hyperacétylation des histones (Takebayashi *et al.*, 2001; Meng *et al.*, 2011).

D'après l'ensemble de ces éléments, il est clair que l'acétylation des histones et la méthylation de l'ADN ne sont pas des processus indépendants mais bel et bien des mécanismes inter-connectés agissant de concert pour réguler l'expression des gènes.

C.10 Auto-administration de cocaïne et épigénétique

Très peu d'études à ce jour montrent l'impact des marques épigénétiques dans le comportement d'AA de cocaïne et toutes ciblent l'acétylation des histones. Dans notre équipe, nous avons montré que l'inhibition des HDACs par la trichostatine A diminuait la consommation et la motivation de l'animal pour la drogue et régulait différenciellement de nombreux gènes dont certains facteurs épigénétiques (Romieu *et al.*, 2008; Host *et al.*, 2010, 2011). Notons que ces résultats ont été obtenus en injectant les inhibiteurs dès la première session d'AA de cocaïne. Des résultats différents, c'est-à-dire une augmentation du comportement d'AA dans les protocoles de FR et de PR, ont été observés lorsque l'injection des inhibiteurs des HDACs avait lieu après la période d'acquisition du comportement d'auto-administration (Sun *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010).

Concernant l'implication de la méthylation de l'ADN, seuls trois articles font état de l'utilisation d'inhibiteurs de DNMTs mais seulement dans le cas d'injections passives de cocaïne et non dans un paradigme d'AA. De plus, les effets sur la préférence de place conditionnée à la cocaïne ou l'hyperlocomotion induite par la drogue sont contradictoires selon la structure cérébrale ciblée par l'injection des inhibiteurs (Anier *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2010; LaPlant *et al.*, 2010).

Compte tenu de ces données, nous avons voulu tester l'implication de la méthylation de l'ADN du SNC dans la prise volontaire de cocaïne chez le rat. Nous avons choisi d'injecter les inhibiteurs des DNMTs dans les ventricules latéraux afin de toucher, dans la mesure du possible, l'ensemble du cerveau. Les paramètres des sessions d'AA de cocaïne ainsi que ceux de l'injection des inhibiteurs des DNMTs (doses et intervalle de temps entre l'injection et les sessions d'AA) ont été choisis en fonction des travaux antérieurs de l'équipe concernant les inhibiteurs des HDACs ainsi que des données de la littérature disponibles sur les inhibiteurs des DNMTs (Romieu *et al.*, 2008; Anier *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2010; LaPlant *et al.*, 2010).

Afin d'établir un lien entre la modification du comportement d'AA et la régulation de la méthylation et de l'expression des gènes dans nos différentes conditions expérimentales, une étude du méthylome ainsi qu'une mesure de l'expression de gènes candidats ont été réalisées. Ces mesures ont été déterminées dans le CPFm car cette structure cible du système dopaminergique, donc impliquée dans les effets renforçants de la cocaïne, joue un rôle majeur dans les processus cognitifs volontaires (prise de décision, initiation / inhibition de l'action).

Objectifs de thèse

Travaux antérieurs de l'équipe :

(Cassel *et al.*, 2006; Romieu *et al.*, 2008, 2011; Carouge *et al.*, 2010; Host *et al.*, 2010, 2011)

- La prise de cocaïne modifie l'expression de facteurs épigénétiques régulant la conformation de la chromatine, tels que des histones désacétylases et des protéines de liaison à l'ADN méthylé.
- Les inhibiteurs des histones désacétylases diminuent le comportement d'AA de cocaïne chez le rat et régulent différemment des gènes impliqués dans la plasticité cérébrale.

Problématique :

- La méthylation de l'ADN participe-t-elle également à ces régulations ?
- Quels sont les gènes donc les mécanismes neurobiologiques potentiellement impliqués dans la modification de ce comportement ?

Objectifs de thèse :

- Agir sur l'état de méthylation du génome en injectant des inhibiteurs des ADN méthyltransférases dans le SNC et tester leur effet dans divers protocoles d'AA de cocaïne.
- Caractériser, dans un deuxième temps, un ensemble de gènes différemment méthylés dans le CPFm. Ces gènes nous renseigneront sur les mécanismes neurobiologiques responsables des modifications comportementales.

Résultats

Expérimentaux

Chapitre I : Les inhibiteurs de DNMTs régulent le comportement d'AA de cocaïne

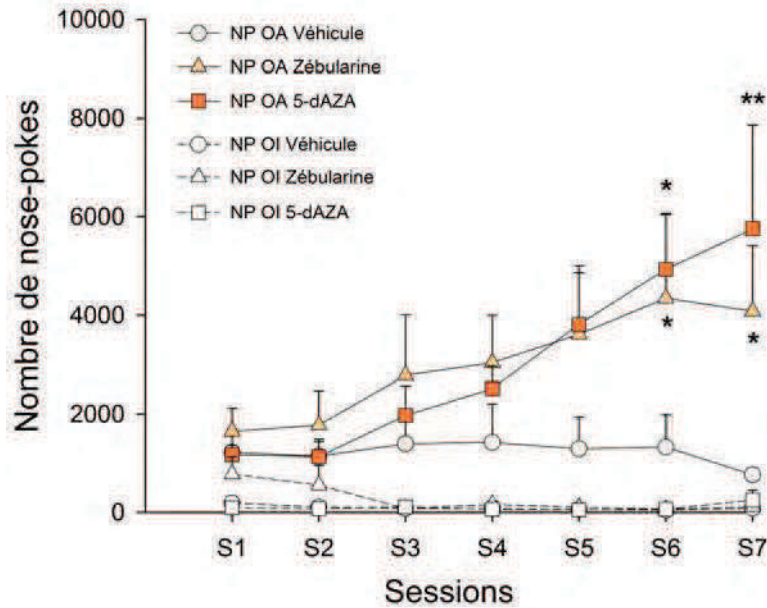
A - Augmentation de la consommation de cocaïne

Après avoir implanté un cathéter dans la veine jugulaire ainsi que des guide-canules dans les ventricules latéraux, des rats ont été soumis à des sessions d'AA intraveineuse de cocaïne selon un protocole de « fixed-ratio » (FR) (0,33 mg/kg/injection) pendant treize jours consécutifs à raison d'une session de deux heures par jour. Vingt minutes avant chaque session d'AA, des inhibiteurs de DNMTs (5-dAZA et zébularine) ont été injectés dans les ventricules latéraux à raison de 5 µg/jour (injection intracérébroventriculaire ou ICV). L'injection étant unilatérale, le côté a été contre-balancé de manière quotidienne.

L'acquisition du comportement d'AA a été réalisée en soumettant d'abord les animaux à un protocole FR1 dans lequel chaque NP dans l'orifice actif (hors période réfractaire) donne lieu à une injection de cocaïne dans le cathéter. Six sessions sous le protocole FR1 ont été réalisées de sorte que l'ensemble des animaux atteigne les critères d'acquisition du comportement d'AA. Les critères comportent **1)** plus de 80 % de NPs dans l'orifice actif, **2)** le nombre d'injections doit rester stable pendant trois sessions consécutives, tout en acceptant une marge de 10 %. Le traitement ICV quotidien par les inhibiteurs n'ayant affecté ni le conditionnement opérant, ni la consommation de cocaïne, on peut conclure que la 5-dAZA et la zébularine n'altèrent pas l'acquisition du comportement d'AA intraveineuse de cocaïne.

Nous avons ensuite réalisé sept sessions consécutives sous le protocole FR5, dans lequel 5 NPs sont nécessaires pour obtenir chaque injection intraveineuse de cocaïne. L'injection ICV des inhibiteurs de DNMTs a toujours été réalisée 20 minutes avant le début des sessions d'AA. Sous ce protocole, on constate une augmentation progressive du nombre de NPs (Figure 11A) dans l'orifice actif chez les animaux traités par les inhibiteurs de DNMTs [Interaction traitement x session : $F(12, 113) = 2,22$; $p = 0,015$]. Les animaux traités réalisent ainsi entre 3 et 7 fois plus de NPs dans l'orifice actif que les animaux contrôles pour les sessions 6 et 7 ($p < 0,05$). Puisque le nombre de NPs dans l'orifice inactif ne varie pas, le pourcentage de NPs dans l'orifice actif reste supérieur à 80 % et n'est pas altéré par les inhibiteurs de DNMTs, quelle que soit la session considérée [Interaction traitement x session : $F(12, 114) = 1,55$; $p = 0,116$].

A



B

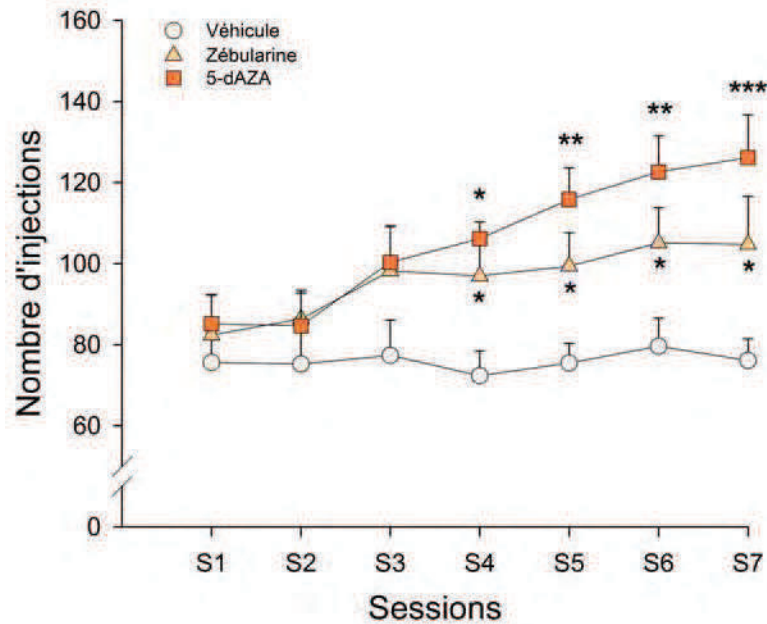


Figure 11 : Effet de l'injection ICV d'inhibiteurs de DNMTs sur la consommation de cocaïne de rats soumis à un protocole de FR5

Chaque point représente la moyenne \pm l'erreur-type (SEM) ; * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ vs véhicule ; ANOVA à deux facteurs (session = mesure répétée) et test post-hoc de Student-Newman-Keuls.

(A) Nombre de « nose-pokes » réalisés au cours des diverses sessions quotidiennes dans l'orifice actif, c'est-à-dire associés avec le déclenchement d'une injection intraveineuse de cocaïne (NP OA, symboles colorés), et dans l'orifice inactif (NP OI, symboles vides). Les rats ont été traités soit par la 5-dAZA (□ ; $n=6$), soit par la zébularine (△ ; $n=8$), soit par la solution véhicule DMSO 10 % (○ ; $n=8$). (B) Nombre d'injections de cocaïne (0,33 mg/kg/injection) réalisées par les mêmes animaux. Effet général du traitement : $F(2, 19) = 4,71$ $p = 0,022$; zébularine vs véhicule : $p = 0,045$; 5-dAZA vs véhicule : $p = 0,023$.

Chapitre I : Les inhibiteurs de DNMTs régulent le comportement d'AA de cocaïne

Cette augmentation du nombre de NPs dans l'orifice actif se traduit par une augmentation progressive au fil des sessions quotidiennes du nombre d'injections de cocaïne réalisées par les animaux traités par les inhibiteurs (Figure 11B) [Interaction traitement x session : $F(12, 113) = 2,24$, $p = 0,014$]. Ainsi, sur les quatre dernières sessions, les animaux traités par la zébularine réalisent plus de 30 % d'injections supplémentaires par rapport aux animaux contrôles et les animaux traités par la 5-dAZA entre 47 % et 65 % ($p < 0,05$).

Ces résultats ont été obtenus avec la dose d'inhibiteurs de DNMTs de 5 $\mu\text{g}/\text{session}$. Nous avons recherché un effet de la dose en réalisant la même expérience avec une dose d'inhibiteurs dix fois moindre, soit 0,5 $\mu\text{g}/\text{session}$. A cette dose, nous n'avons pas observé d'augmentation significative du nombre d'injections de cocaïne chez les animaux soumis au protocole FR5. L'effet des inhibiteurs est donc dépendant de la dose injectée (Figure 12).

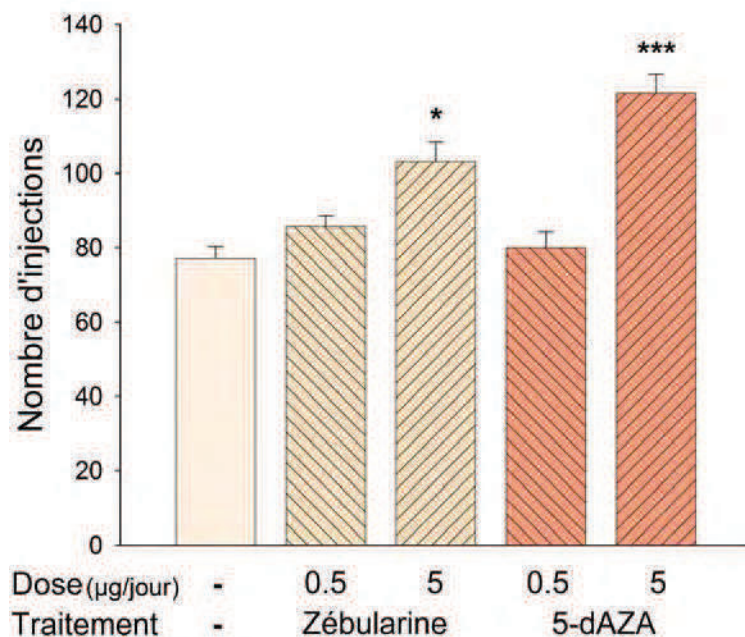


Figure 12 : Effet dose-dépendant des inhibiteurs de DNMTs sur la consommation de cocaïne sous le protocole de FR5

Chaque barre représente la moyenne \pm SEM du nombre d'injections de cocaïne réalisées lors des sessions 5 à 7 sous le protocole FR5 par les animaux traités par les inhibiteurs de DNMTs (barres hachurées) et les animaux contrôles (barre non hachurée). * $p < 0,05$ et *** $p < 0,001$ vs véhicule ($n=5$ pour les groupes d'animaux traités par la dose de 0,5 $\mu\text{g}/\text{session}$ et $n=6$ à 8 pour les animaux traités par la dose de 5 $\mu\text{g}/\text{session}$) ANOVA à deux facteurs (session / mesure répétée) et test post-hoc de Student-Newman-Keuls. Effet général du traitement : $F(4, 27) = 7,28$ $p < 0,001$; zébularine à 0,5 $\mu\text{g}/\text{jour}$ vs véhicule : $p = 0,662$; 5-dAZA à 0,5 $\mu\text{g}/\text{jour}$ vs véhicule : $p = 0,871$.

B - Augmentation des propriétés renforçantes

La première expérience ayant été réalisée avec la dose de cocaïne de 0,33 mg/kg/injection, nous avons cherché à déterminer dans quelle mesure le traitement ICV par les inhibiteurs de DNMTs modifiait les propriétés renforçantes de la cocaïne. Pour ce faire, nous avons mis au point un protocole dans lequel la dose de cocaïne infusée à chaque injection diminue par paliers au sein de chaque session quotidienne d'AA (0,75 / 0,33 / 0,25 / 0,125 / 0 mg/kg/injection). Après une période d'acquisition du comportement d'AA étalée sur huit sessions sous un protocole de FR dans lequel les rats reçoivent la dose de 0,33 puis de 0,75 mg/kg/injection, ils ont été traités par la solution véhicule. Huit sessions « dose-réponse » ont été établies jusqu'à ce que le nombre moyen d'injections soit stable pour chaque dose de cocaïne. Les mêmes rats ont ensuite été traités par la 5-dAZA pendant 8 sessions « dose-réponse » supplémentaires.

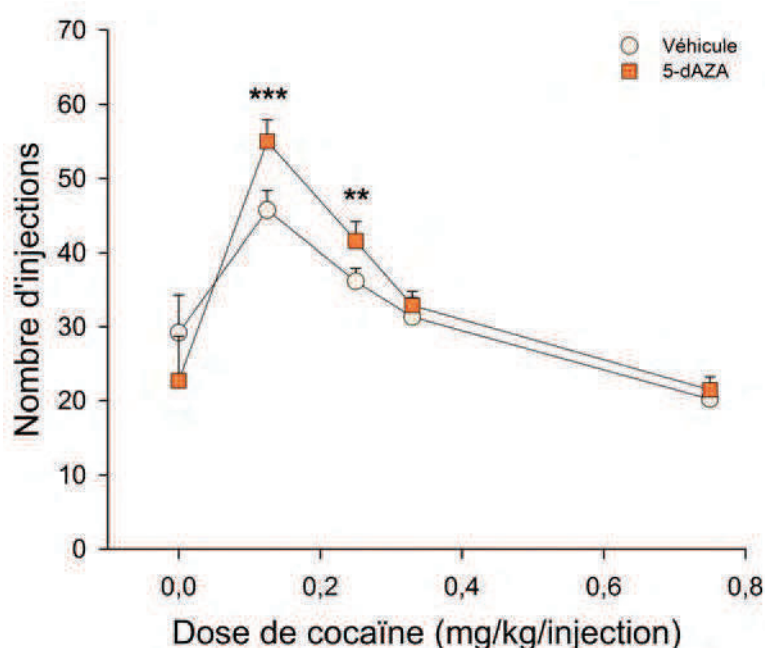


Figure 13 : Effet de la 5-dAZA dans un protocole de dose-réponse à la cocaïne

Chaque point représente la moyenne \pm SEM du nombre d'injections de cocaïne réalisées lors des sessions 6 à 8 par des rats ($n=7$) traités par la solution véhicule DMSO 10 % (○) pendant huit jours puis par la 5-dAZA (□) pendant huit sessions supplémentaires. $**p < 0,01$ $***p < 0,001$ vs véhicule ; ANOVA à trois facteurs répétés et test post-hoc de Student-Newman-Keuls.

Chapitre I : Les inhibiteurs de DNMTs régulent le comportement d'AA de cocaïne

La Figure 13 montre que la courbe dose-réponse de cocaïne prend la forme d'un U inversé. De plus, le traitement par la 5-dAZA augmente la consommation de cocaïne aux doses de 0,25 et 0,125 mg/kg/injection [Interaction traitement x dose : $F(4, 24) = 7,80$ $p < 0,001$]. Il apparaît que la courbe dose-réponse de cocaïne subit un déplacement vers le haut suite au traitement par la 5-dAZA. Ce résultat indique que la 5-dAZA augmente bien les propriétés renforçantes de la cocaïne.

Enfin, après les huit jours de traitement par la 5-dAZA, les rats ont été soumis à huit sessions quotidiennes supplémentaires, sans traitement au préalable par les inhibiteurs. Dans ces conditions, l'augmentation de la consommation de cocaïne est restée relativement stable pendant 3-4 jours après l'arrêt du traitement par la 5-dAZA puis revenait progressivement au niveau initial. Cette expérience nous renseigne sur la réversibilité du phénomène.

C - Un effet restreint au protocole FR

Afin de déterminer si les inhibiteurs de DNMTs avaient également un impact sur la motivation des rats à consommer la cocaïne, nous avons testé l'effet du traitement sous un protocole de PR, dans lequel le nombre de NPs requis pour obtenir des injections successives augmente en suivant la fonction exponentielle : $NP_{(n)} = (5e^{0,2n}) - 5$, n représentant le rang des injections successives (Richardson et Roberts, 1996). Les animaux ont tout d'abord acquis le comportement d'AA de cocaïne à l'aide d'un protocole FR à la dose de 0,33 mg/kg/injection, puis ils ont été soumis à un protocole de PR, soit à la dose de 0,33 mg/kg/injection (Figure 14A), soit à la dose de 0,1 mg/kg/injection (Figure 14B). Cette figure montre que le traitement par les inhibiteurs de DNMTs ne s'est pas avéré capable de modifier le comportement d'AA des rats soumis au protocole de PR, ce qui indique que l'inhibition des DNMTs n'altère pas la motivation des animaux pour la cocaïne.

Nous avons également cherché à tester l'effet de l'inhibition des DNMTs dans un protocole de réinstallation du comportement de recherche de drogue après une période de sevrage, afin de modéliser l'impact de la méthylation de l'ADN sur la rechute. Après 14 sessions quotidiennes d'AA sous le protocole de FR avec injection ICV de 5-dAZA, les rats ont été soumis à des périodes de sevrage allant de deux à cinq semaines. Nous avons injecté la 5-dAZA pendant les quatre jours précédant l'expérience de réinstallation amorcée par une injection intrapéritonéale de cocaïne. Nous n'avons observé aucun effet consistant et significatif de la 5-dAZA dans ces expériences visant à modéliser la rechute. A titre d'exemple, la Figure 15 illustre le nombre de NPs qu'ont réalisés les rats traités et les rats contrôles dans l'orifice actif pendant une session de deux heures de réinstallation du comportement de recherche de cocaïne après cinq semaines de sevrage.

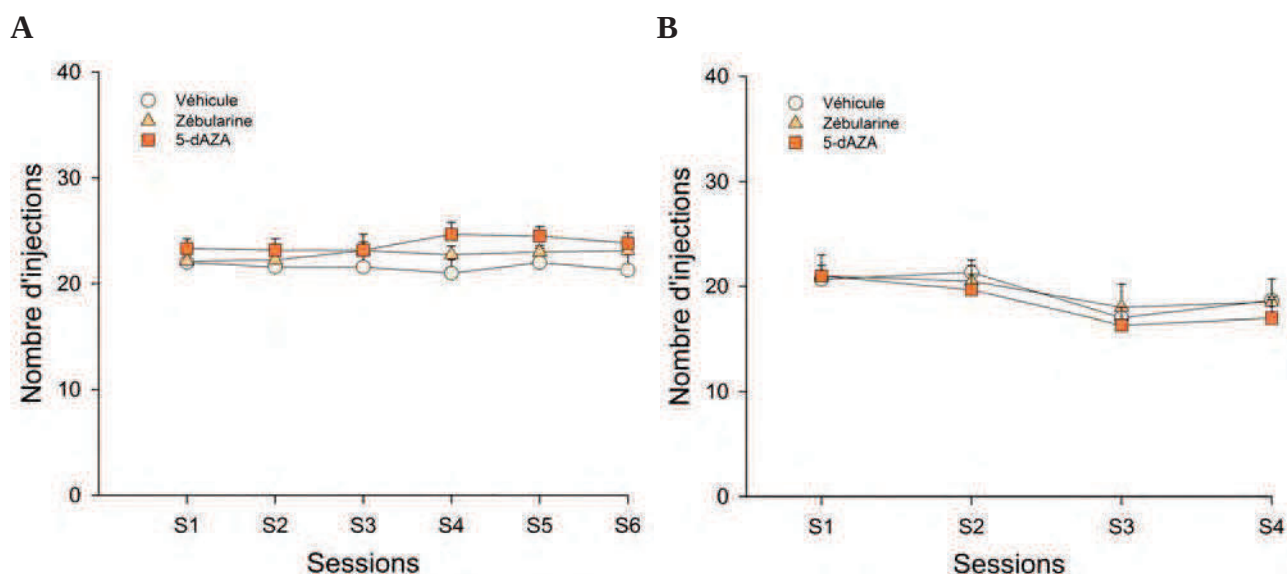


Figure 14 : Effet des inhibiteurs de DNMTs sur le comportement d'AA sous un protocole de PR

Chaque point représente la moyenne \pm SEM du nombre d'injections de cocaïne réalisées à la dose de 0,33 mg/kg/injection (A) ou à la dose de 0,1 mg/kg/injection (B) par des rats traités soit par la 5-dAZA (\square), soit par la zébularine (\triangle), soit par la solution véhicule DMSO 10 % (\circ).

Effet général du traitement en (A) : $F(2, 18) = 1,16$ $p = 0,335$ ($n=6$ à 8) ; Effet général du traitement en (B) : $F(2, 5) = 0,16$ $p = 0,859$ ($n=2$ à 3) ; ANOVA à deux facteurs (session = mesure répétée) et test post-hoc de Student-Newman-Keuls.

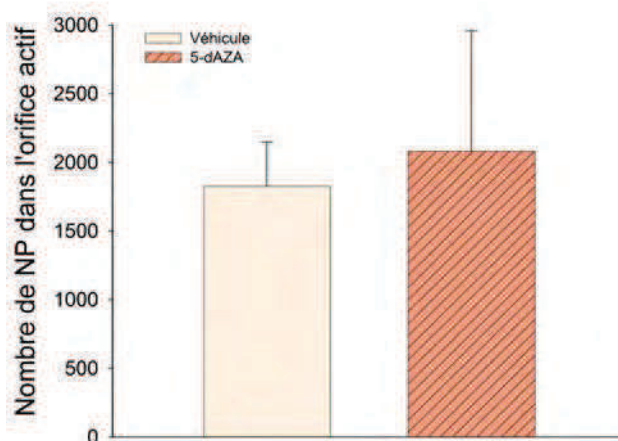


Figure 15 : Effet de la 5-dAZA sur la réactivation du comportement de recherche de cocaïne après sevrage

Chaque barre représente la moyenne \pm SEM du nombre de NPs réalisés dans l'orifice actif par les animaux traités par la 5-dAZA (barres hachurées) et les animaux contrôles (barres non hachurées). L'expérience de rechute a été réalisée après 14 sessions quotidiennes de FR suivies de 5 semaines de sevrage ($n=4$ pour chaque groupe) ; test t de Student : $t(6) = -0,27$ $p = 0,794$.

Chapitre I : Les inhibiteurs de DNMTs régulent le comportement d'AA de cocaïne

Pour résumer, nous avons montré que la consommation de cocaïne augmente chez des rats traités par la 5-dAZA ou la zébularine, et ce, à diverses doses de cocaïne, indiquant que l'inhibition des DNMTs augmente les propriétés renforçantes de la cocaïne. De plus, dans nos conditions expérimentales, cet effet s'est avéré se restreindre au protocole de FR, suggérant que les inhibiteurs de DNMTs n'affectent pas ou peu la motivation des animaux pour la drogue ainsi que la réinstallation d'un comportement de recherche après une période de sevrage.

Afin de valider nos analyses ultérieures du méthylome, deux groupes expérimentaux supplémentaires ont été soumis aux mêmes conditions expérimentales que les rats issus des expériences d'AA de cocaïne, le protocole de FR leur permettant de s'auto-administrer une solution saline (NaCl 9 %) en lieu et place de la solution de cocaïne. Ils ont été traités par des injections ICV de manière similaire aux rats s'auto-administrant la cocaïne, soit par la 5-dAZA, soit par la solution véhicule. Leur comportement n'étant pas renforcé par la cocaïne, ces groupes constituent des contrôles permettant d'isoler l'effet de la cocaïne ou de la 5-dAZA dans l'analyse de la méthylation et de l'expression des gènes. Au final, quatre groupes expérimentaux ont ainsi été constitués. Il s'agit des groupes nommés :

- AA NaCl + véhicule
- AA NaCl + 5-dAZA
- AA cocaïne + véhicule
- AA cocaïne + 5-dAZA.

Chapitre II : Caractérisation des gènes différentiellement méthylés

A - Analyse du méthylome

A.1 Protocole utilisé : séquençage « nouvelle génération »

Afin de tenter de décrire les mécanismes sous-jacents aux modifications du comportement d'AA de cocaïne suite à l'administration d'inhibiteurs de DNMTs, un séquençage quantitatif à haut débit a été réalisé dans le but de caractériser des gènes différentiellement méthylés dans nos conditions expérimentales (Figure 16). Nous avons prélevé les CPFm de rats issus des expériences conduites sous le protocole de FR, ainsi que ceux de rats s'étant auto-administré une solution saline au lieu de la cocaïne. Les CPFm de deux animaux ont été réunis pour chaque groupe expérimental. Trois groupes ont ainsi été analysés : AA NaCl + véhicule, AA cocaïne + véhicule et AA cocaïne + 5-dAZA. L'analyse du méthylome a entièrement été réalisée par la société Active Motif (Carlsbad, Californie). L'ADN génomique a été extrait des tissus, purifié puis fragmenté aléatoirement par sonication en fragments de 150 à 300 paires de bases. Puis, des séquences adaptatrices ont été ajoutées aux extrémités des fragments soniqués afin de permettre leur séquençage ultérieur. Les fragments méthylés ont ensuite été enrichis par liaison au complexe protéique MBD2b/MBD3L1, qui reconnaît spécifiquement les 5-mC et pas les cytosines non méthylées, ni les 5-hmC. A l'aide d'amorces, des bibliothèques ont été créées avec les fractions enrichies en ADN méthylé, ainsi qu'avec l'ADN soniqué de départ (« input »). Ces bibliothèques ont été séquencées à l'aide d'un séquenceur à haut débit Illumina. Les 26 à 36 millions de fragments de 50 nucléotides séquencés ont ensuite été alignés avec l'ADN génomique de rat et ont subi une série d'ajustements. Tout d'abord, n'ont été conservées que les séquences présentes en un seul exemplaire dans le génome et s'alignant avec pas plus de deux défauts d'appariement. Les duplicats de PCR issus de la création des bibliothèques ont également été écartés et l'ensemble des séquences restantes a été réduit pour chaque condition expérimentale à 16,3 millions, soit le nombre de séquences présentes dans le plus petit échantillon (condition AA cocaïne + 5-dAZA). Ces séquences de 50 nucléotides restantes ont ensuite été étendues *in silico* à une longueur de 150 à 250 nucléotides. Après avoir divisé arbitrairement le génome en fractions de 32 nucléotides, les fragments à l'intérieur de chaque fraction ont été quantifiés. Enfin, les régions du génome enrichies en 5-mC par rapport à l'« input »

ont été caractérisées à l'aide de l'algorithme MACS (« Model-based analysis of ChIP-Seq ») (Zhang *et al.*, 2008). Ainsi, entre 140 et 146 millions de régions enrichies en 5-mC ont été identifiées pour chaque condition expérimentale. On retrouve entre 78 et 80 % des régions méthylées dans les trois échantillons, ce qui indique qu'il n'y a pas de changement majeur de la méthylation globale de l'ADN. Ces fragments enrichis en 5-mC ont été regroupés et ont abouti à la caractérisation de 188 926 régions différentiellement méthylées (DMRs) par la cocaïne et/ou la 5-dAZA sur l'ensemble du génome de rat. Chaque DMR est associée à un ou plusieurs gènes selon qu'elle se situe dans un gène ou dans un intervalle de 10000 paires de bases maximum autour du gène.

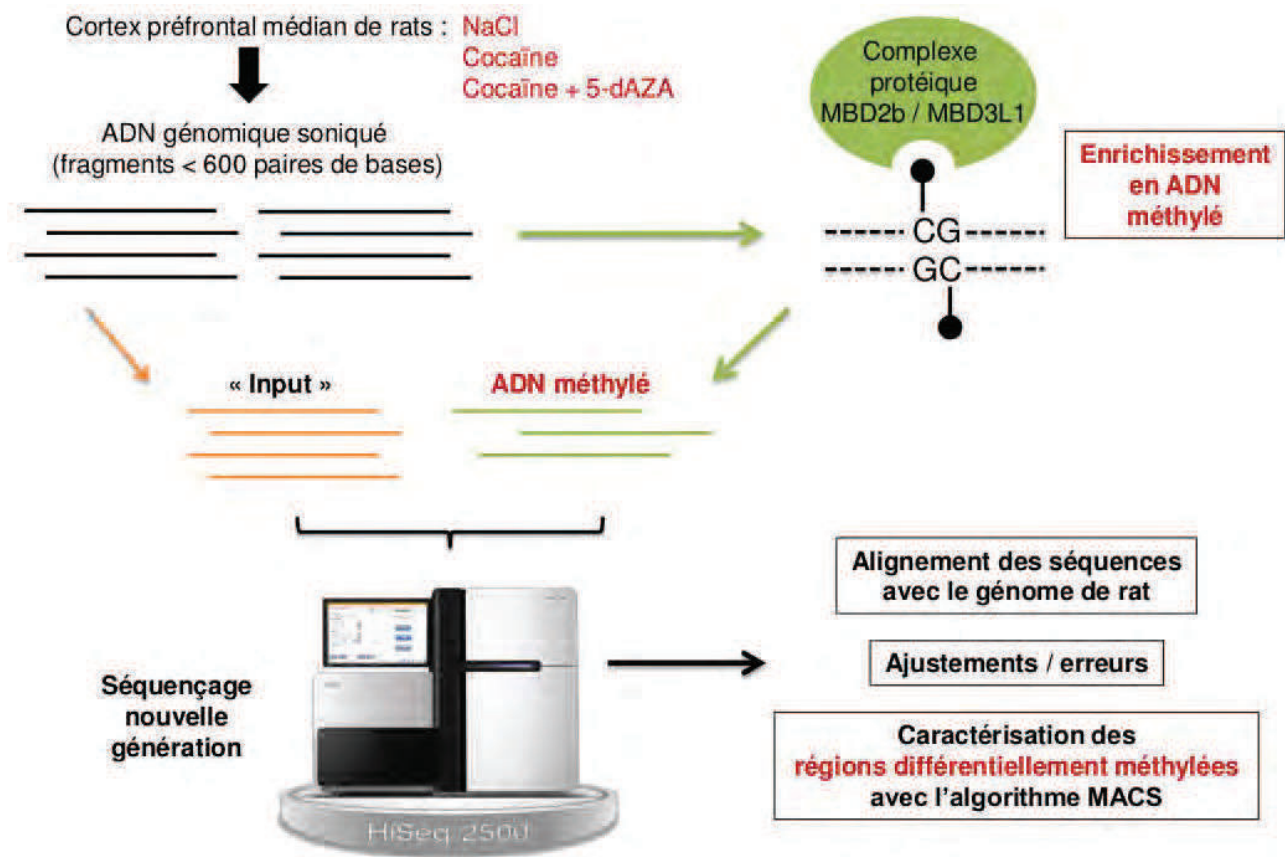


Figure 16 : Analyse du méthylome

L'ADN génomique est extrait des CPFm puis fragmenté par sonication. Les fragments méthylés sont enrichis à l'aide d'un complexe de protéines de liaison à l'ADN méthylé se liant spécifiquement aux 5-mC dans le cadre d'un dinucléotide CpG. Cet ADN méthylé est séquençé, de même que l'ADN génomique de départ ou « Input ». Après alignement sur le génome de rat, une série d'ajustements est réalisée consistant entre autres à ne conserver que les séquences présentes en un seul exemplaire à travers le génome. Les fragments restants sont quantifiés et un algorithme permet de déterminer pour chaque condition expérimentale, l'enrichissement en méthylation par rapport à l'ADN de départ.

A.2 Régions différentiellement méthylées

Sur l'ensemble des DMRs analysées, 57,8 % sont à proximité (± 10000 paires de bases) ou dans les gènes et 42,2 % sont intergéniques (Figure 17). On retrouve 17031 DMRs, soit 9 %, dans les promoteurs en considérant que la région promotrice s'étend de 7500 paires de bases en amont à 2500 paires de bases en aval du début de la transcription. Seuls 12,8 % de ces DMRs dans les régions promotrices sont à proximité du site d'initiation de la transcription (TSS ; ± 500 paires de bases). Il faut souligner le fait que 91 % des variations de méthylation dans nos conditions expérimentales ont lieu en dehors des promoteurs.

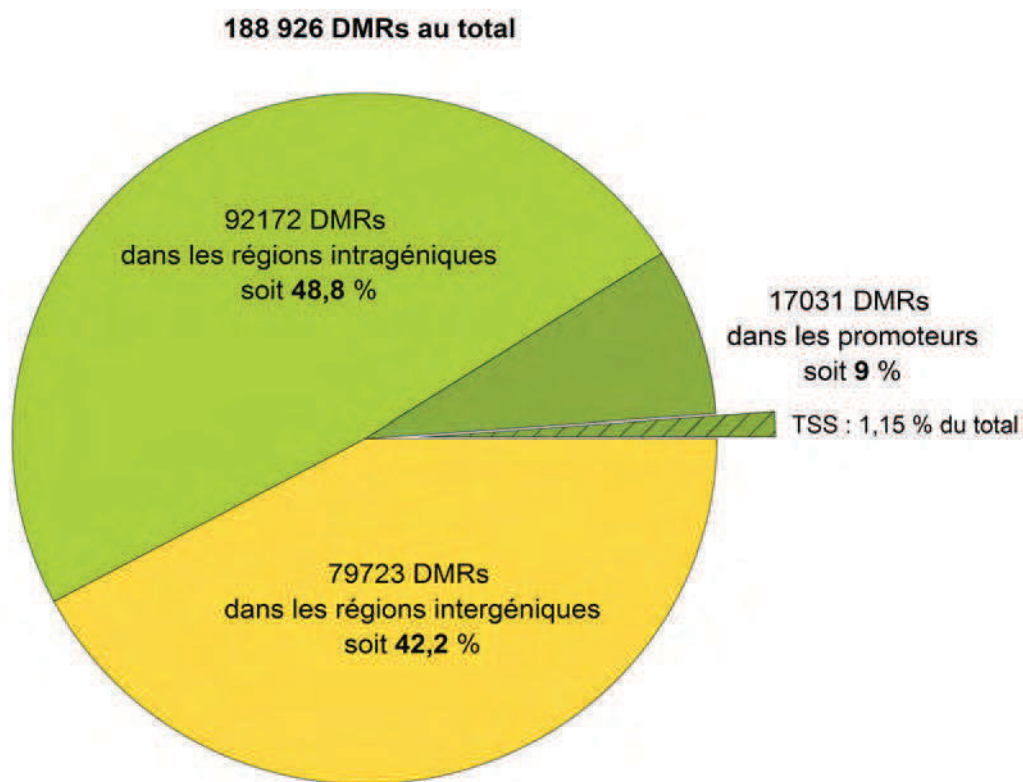


Figure 17 : Position des DMRs à travers le génome

Seules 1,15 % des 188 926 DMRs contiennent ou recouvrent partiellement un îlot CpG (CGI), ce qui signifie que presque 99 % des changements de méthylation ont lieu en dehors des CGIs donc dans les régions moins denses en GC (Figure 18). Les DMRs se situant dans un CGI d'une région promotrice sont au nombre de 657, ce qui correspond à 30,1 % des 2181 DMRs avec îlots. Ces 657 DMRs correspondent à 0,35 % de toutes les DMRs et à 3,9 % des DMRs situées dans les

Chapitre II : Caractérisation des gènes différentiellement méthylés

promoteurs. Il faut en conclure que près de 70 % des CGIs différentiellement méthylés se trouvent en dehors des régions promotrices.

**2181 DMRs contiennent au moins un îlot CpG (CGI)
soit 1,15 % seulement des DMRs totales**

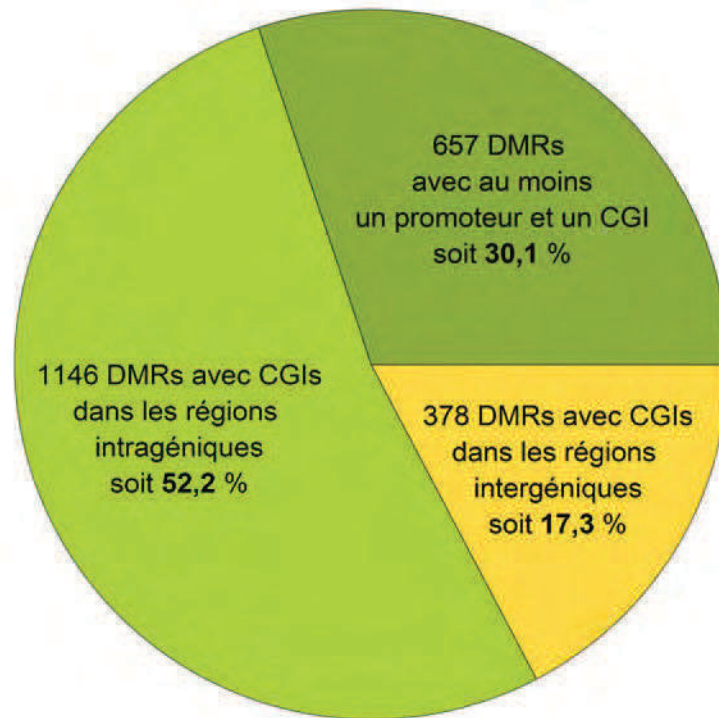


Figure 18 : Position des DMRs contenant au moins un îlot CpG à travers le génome

A.3 Gènes différentiellement méthylés

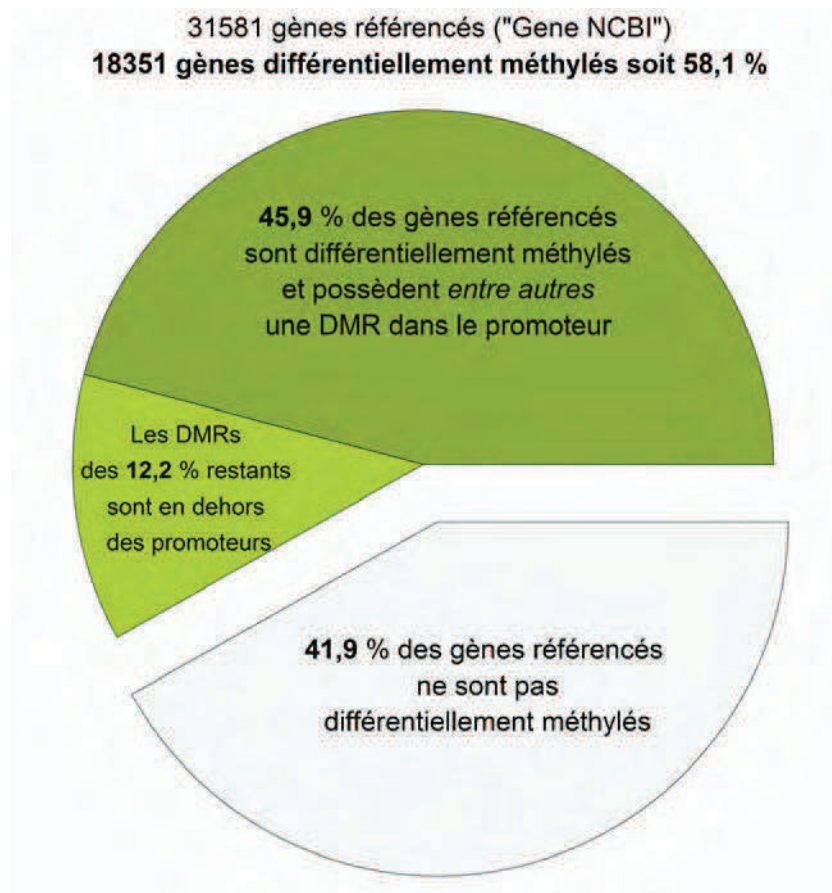


Figure 19 : Gènes différentiellement méthylés

Les fractions en vert représentent les gènes différentiellement méthylés et la fraction grise, les gènes non méthylés.

Notre étude étant réalisée chez le rat, 31581 références de gènes ont été utilisées pour l'analyse du méthylome. Sur l'ensemble de ces gènes, 18351 soit 58,1 % contiennent une DMR (Figure 19). Pour 79 % d'entre eux (soit 45,9 % des gènes référencés), une DMR au moins est située dans la région promotrice, ce qui signifie que, malgré le fait que 91 % des DMRs soient situées en dehors des promoteurs, les 4/5 des gènes différemment méthylés par la cocaïne et/ou la 5-dAZA le sont, entre autres, dans la région promotrice.

Chez le rat, 12461 gènes sont référencés comme possédant un CGI dans leur région promotrice. Seuls 6,6 % d'entre eux sont régulés par la méthylation de l'ADN dans nos conditions.

Cette observation signifie que 93,4 % des gènes possédant un CGI dans le promoteur ne sont pas différemment méthylés dans nos conditions. Il se trouve qu'une très grande majorité de gènes dont la méthylation du promoteur est modifiée, ne possèdent pas de CGI dans leurs régions promotrices. Cette observation est en accord avec la proposition que la méthylation des promoteurs est d'autant plus variable que la densité en GC est faible.

A.4 Effets du traitement par la cocaïne et la 5-dAZA

A.4.1 Au niveau des gènes et des DMRs

La Figure 20 montre les pourcentages de DMRs et gènes les plus fortement hypo- ou hyperméthylés par l'AA de cocaïne ainsi que par le traitement par la 5-dAZA chez des rats s'auto-administrant la cocaïne. On constate que la cocaïne produit surtout une hypométhylation. Ainsi, la cocaïne déméthyle deux fois plus de gènes qu'elle n'en hyperméthyle, même si cette différence est moins accentuée au niveau des DMRs. De même, la proportion de DMRs hypométhylées par la cocaïne est plus forte que celle de DMRs hyperméthylées dans les régions promotrices et intragéniques : 57,8 % contre 54,9 %. Cette proportion est inversée dans les régions intergéniques où une hyperméthylation due à la cocaïne est prépondérante : 45,1 % contre 42,2 % (Tableau 3).

A l'inverse, on constate que la 5-dAZA hyperméthyle, chez les animaux s'auto-administrant la cocaïne, presque deux fois plus de gènes qu'elle n'en déméthyle (Figure 20). Cette différence est présente au niveau des DMRs, pour lesquelles 50 % de plus sont hyperméthylées. Comme dans le cas de la cocaïne, l'hyperméthylation due à la 5-dAZA est plutôt localisée dans les régions promotrices et intragéniques, alors qu'elle entraîne plutôt une hypométhylation des régions intergéniques (Tableau 3). Il faut en conclure que gènes + promoteurs sont enrichis en DMRs hypométhylées par la cocaïne et hyperméthylées par la 5-dAZA.

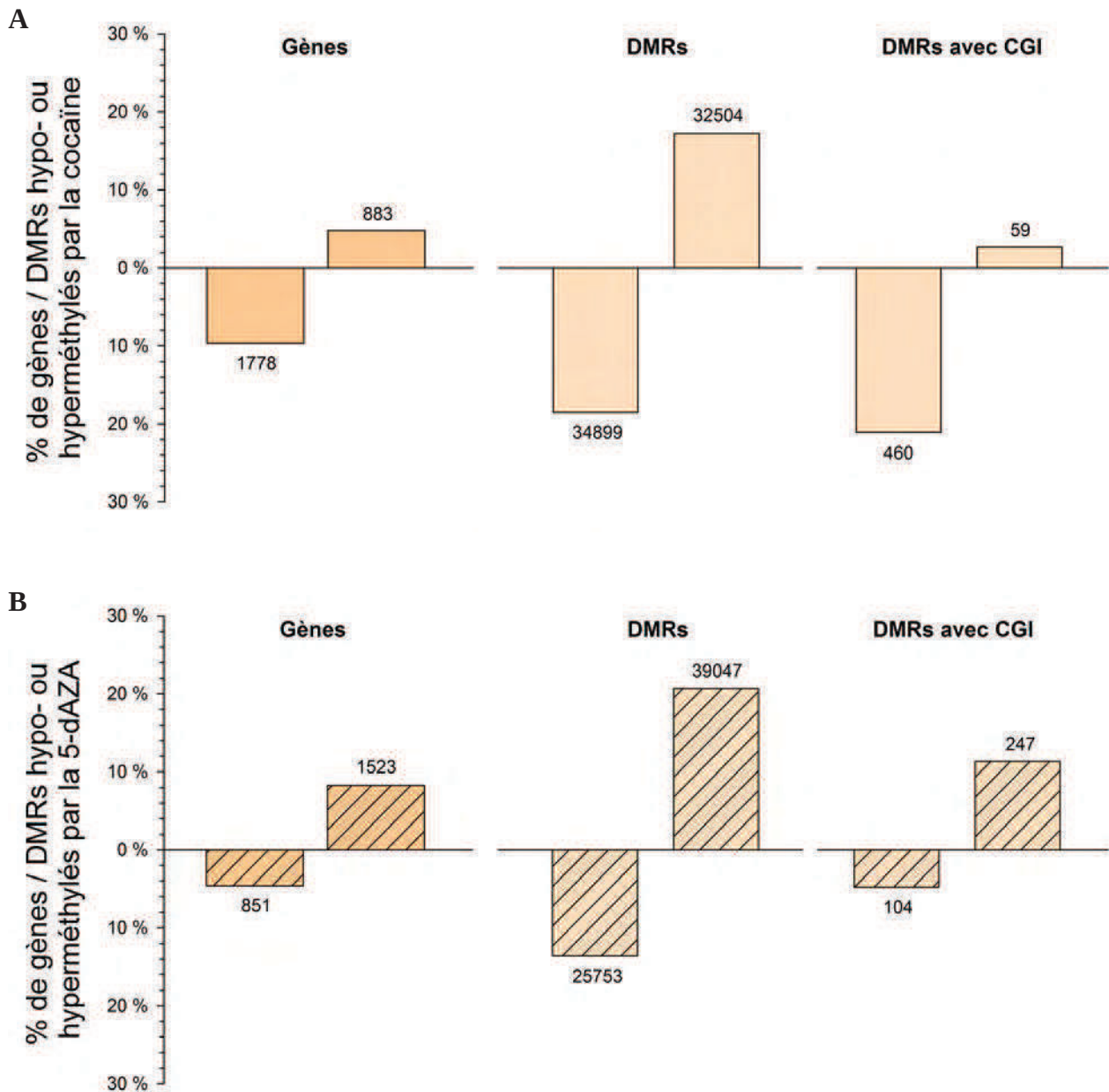


Figure 20 : Effets de la cocaïne et de la 5-dAZA sur le sens de variation de la méthylation

Le nombre de gènes (en plus foncé) et de DMRs (en clair) est indiqué sur chaque barre, qui représente le pourcentage des gènes et DMRs les plus fortement hypométhylés (ratio $\leq 0,75$; barres dirigées vers le bas) ou hyperméthylés (ratio $\geq 1,25$; barres dirigées vers le haut).

(A) Effet de l'AA de cocaïne par rapport aux rats s'auto-administrant la solution saline (=niveau basal ou 0 %) (B) Effet de la 5-dAZA chez des rats s'auto-administrant de la cocaïne (le 0 % symbolise ici la méthylation induite par la cocaïne seule).

Tableau 3 : Effets de la cocaïne et/ou de la 5-dAZA selon la position des DMRs

	Promoteurs	Intragéniques	Intergéniques
DMRs hypométhylées par la cocaïne (ratio $\leq 0,75$)	3377	16799	14723
	9,7%	48,1%	42,2%
DMRs hyperméthylées par la cocaïne (ratio $\geq 1,25$)	2706	15148	14650
	8,3%	46,6%	45,1%
DMRs hypométhylées par la 5-dAZA + cocaïne vs cocaïne seule (ratio $\leq 0,75$)	2260	11793	11700
	8,8%	45,8%	45,4%
DMRs hyperméthylées par la 5-dAZA + cocaïne vs cocaïne seule (ratio $\geq 1,25$)	3718	18723	16606
	9,5%	47,9%	42,5%

A.4.2 Au niveau des îlots CpG

Cet effet sur le sens de variation de la méthylation est encore accentué lorsque l'on considère uniquement les DMRs associées à des CGIs. En effet, la cocaïne hypométhyle alors presque 8 fois plus de régions qu'elle n'en méthyle et la 5-dAZA hyperméthyle 2,4 fois plus de régions qu'elle n'en déméthyle (Figure 20). Le Tableau 4 illustre l'hypométhylation induite par la cocaïne et l'hyperméthylation provoquée par la 5-dAZA. Il en ressort que ces effets ont lieu préférentiellement dans les îlots intragéniques, ce qui montre que la méthylation des CGIs à l'intérieur du corps des gènes est plus sujette à être modifiée que celle des CGIs des régions promotrices.

Tableau 4 : Effets de la cocaïne et/ou de la 5-dAZA selon la position des DMRs se trouvant dans des CGIs

	Promoteurs	Intragéniques	Intergéniques
DMRs avec CGIs hypométhylées par la cocaïne (ratio $\leq 0,75$)	147	224	89
	32,0%	48,7%	19,3%
DMRs avec CGIs hyperméthylées par la cocaïne (ratio $\geq 1,25$)	20	20	19
	33,9%	33,9%	32,2%
DMRs avec CGIs hypométhylées par la 5-dAZA + cocaïne vs cocaïne seule (ratio $\leq 0,75$)	34	34	36
	32,7%	32,7%	34,6%
DMRs avec CGIs hyperméthylées par la 5-dAZA + cocaïne vs cocaïne seule (ratio $\geq 1,25$)	86	101	60
	34,8%	40,9%	24,3%

A.4.3 Les effets de la cocaïne et de la 5-dAZA ne sont pas indépendants

Sur les 2661 gènes régulés par la cocaïne, 38,5 % d'entre eux le sont aussi par la 5-dAZA. Étonnamment, on observe une corrélation inverse entre les deux traitements en ce qui concerne le sens de régulation de la méthylation. Ainsi, la 5-dAZA hyperméthyle les gènes déjà hypométhylés par la cocaïne à l'inverse elle déméthyle les gènes hyperméthylés par la cocaïne seule (Figure 21). Ce résultat suggère que ce sont les mêmes régions / gènes qui sont ciblés par les processus de méthylation. La régulation opposée ne peut, par contre, pas être expliquée aisément.

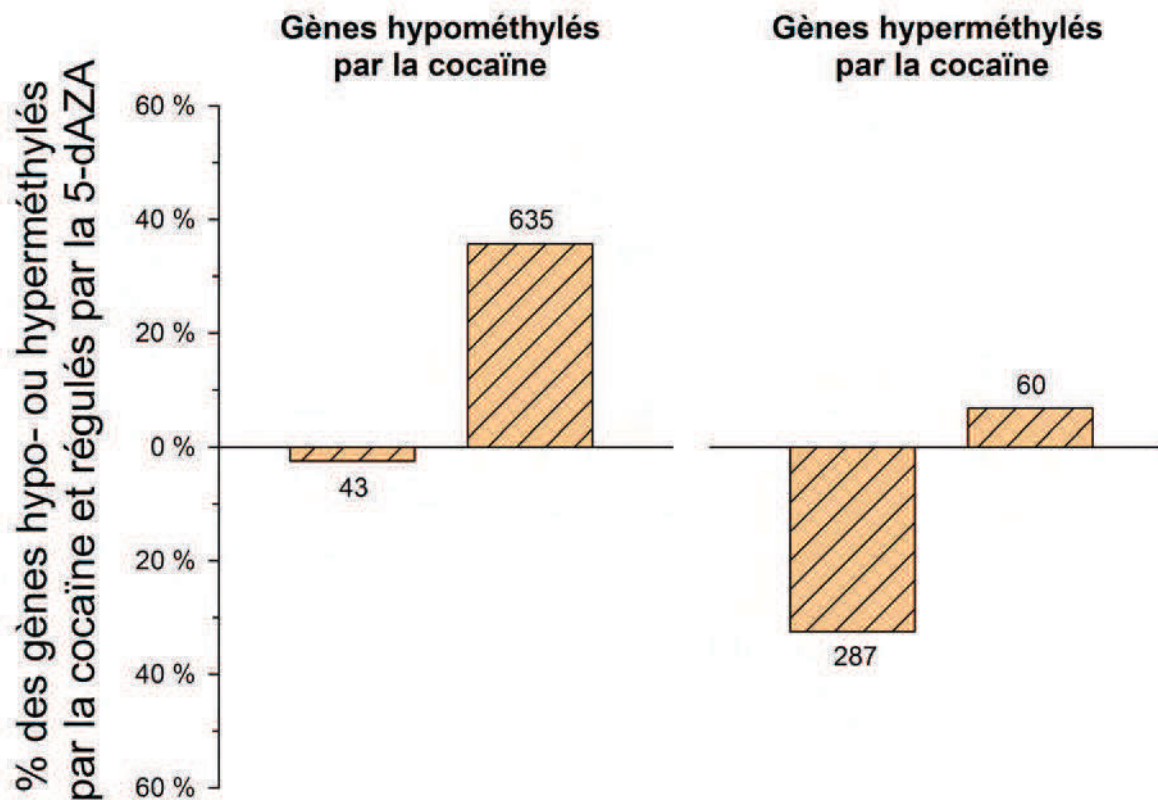


Figure 21 : Corrélation entre le sens de variation de la méthylation induit par les deux traitements

Le nombre de gènes est indiqué sur chaque barre, qui représente le pourcentage de gènes hypométhylés (barres dirigées vers le bas) ou hyperméthylés (barres dirigées vers le haut) par la 5-dAZA sur le nombre total de gènes déjà hypométhylés ou hyperméthylés par la cocaïne.

B - Gènes présentant une méthylation modifiée

Dans le but de valider les résultats concernant l'ensemble de la séquence génomique, nous avons choisi une vingtaine de régions en relation ou comprises dans des gènes dont la participation à la plasticité neuronale est avérée. Ces gènes sont des candidats pour participer aux mécanismes neurobiologiques sous-jacents aux modifications notées en réponse à la cocaïne ou à la 5-dAZA.

L'enrichissement en méthylation des DMRs a été quantifié par PCR quantitative (qPCR). Pour ce faire, les CPFm de rats ayant été soumis au protocole de FR ont été prélevés. Quatre groupes ont été constitués : AA NaCl + véhicule, AA NaCl + 5-dAZA, AA cocaïne + véhicule et AA cocaïne + 5-dAZA. L'ADN génomique a été extrait des CPFm, purifié puis fragmenté aléatoirement par sonication (fragments < 600 paires de bases). La taille des fragments a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose. Les fragments méthylés ont ensuite été enrichis à l'aide du même système que pour l'analyse du méthylome, le « MethylCollector® Ultra, Active Motif », qui utilise le complexe protéique MBD2b/MBD3L1 reconnaissant spécifiquement les 5-mC et pas les cytosines non méthylées, ni les 5-hmC. Des amorces de qPCR ont été conçues spécifiquement pour chaque DMR sélectionnée. Il faut noter que les DMRs sont des régions riches, voire parfois très riches en GC qui comprennent souvent des séquences consensus trouvées aussi en plusieurs exemplaires à travers le génome. De ce fait, la conception d'amorces spécifiques est compliquée et n'a pu être réalisée pour certaines DMRs (voir Matériels et Méthodes Chapitre II : B.3). Un autre obstacle majeur a été rencontré lors de la validation des amorces de qPCR. Ce problème, sans doute lié au fort contenu en GC des séquences enrichies ainsi qu'au très faible rendement de l'enrichissement en ADN méthylé, s'est traduit par des réactions de qPCR ne suivant pas la progression exponentielle attendue et/ou par des efficacités de réaction ne permettant pas de quantifier de manière satisfaisante les DMRs (voir Matériels et Méthodes Chapitre II : B.3). Ce problème ne s'est présenté qu'avec les fractions d'ADN enrichies en 5-mC et non avec les fractions « inputs ». Au final, seuls 10 % environ des couples d'amorces se sont révélés acceptables, donc les variations de méthylation n'ont pu être mesurées que pour quelques DMRs caractérisées lors du séquençage.

L'expression des gènes caractérisés par une méthylation différentielle a été mesurée en parallèle. L'approche classique de transcription inverse suivie de qPCR (RT-qPCR) a été utilisée pour chercher à corrélérer les variations de méthylation et d'expression.

B.1 Le cas particulier du gène *Hdac2*

HDAC2 est une histone désacétylase appartenant à la classe I et retrouvée essentiellement dans le noyau. Elle participe à l'intégration des complexes répresseurs de la transcription après être recrutée par des protéines de liaison à l'ADN méthylé telles que MeCP2. Présente dans les structures du système de récompense, elle est considérée comme ayant un rôle fondamental dans la plasticité cérébrale (voir Contexte Scientifique B.2.2). La transcription du gène *Hdac2* est régulée par la cocaïne, comme l'attestent plusieurs publications dont certaines de notre laboratoire (Cassel *et al.*, 2006; Host *et al.*, 2011; Echeverry-Alzate *et al.*, 2014). C'est pourquoi ce gène a été sélectionné pour être validé, parmi l'ensemble des gènes différentiellement méthylés. Situé sur le chromosome 20 et long de 23 kb, le gène *Hdac2* peut aboutir à la transcription de 18 variants d'épissage alternatif chez l'homme, 4 chez la souris et un seul chez le rat. Chez le rat, le gène possède 14 exons et sa traduction donne lieu à une protéine de 488 acides aminés de masse moléculaire 55 kDa. Lors de l'analyse du méthylome, cinq DMRs ont été caractérisées pour ce gène, toutes intragéniques (Figure 22). Quatre d'entre elles recouvrent des exons et seule la DMR 110816, recouvrant l'exon 9, est différentiellement méthylée par la cocaïne alors que les DMRs 110817 et 110818 sont régulées par la 5-dAZA. Le CGI recouvrant le promoteur 5' n'est pas différentiellement méthylé dans nos conditions expérimentales.

La méthylation de la DMR 110816 a pu être validée par qPCR. Dans cette région intragénique, la cocaïne diminue bel et bien la densité de méthylation (Figure 23A) [Effet général de la cocaïne : $F(1, 11) = 13,36$; $p = 0,004$]. Nous avons également montré que la cocaïne augmentait l'expression de *Hdac2* dans le CPFm (Figure 23B) [Effet général de la cocaïne : $F(1, 9) = 13,98$; $p = 0,005$]. Afin de compléter cette étude, nous avons quantifié l'expression de la protéine par Western Blot (Figure 23C). La variabilité intrinsèque à la condition AA cocaïne + véhicule combinée au faible effectif montre une augmentation de la quantité de protéine HDAC2 par la cocaïne à la limite de la significativité [$T = 18$; $n_1 = 4$, $n_2 = 3$; $p = 0,057$]. D'autre part, une étude par immunomarquage (Figure 23D) réalisée précédemment au laboratoire avait montré que l'AA de cocaïne augmentait bien le nombre de cellules exprimant HDAC2 dans le cortex cingulaire antérieur, une des trois régions du CPFm (Host *et al.*, 2011). Enfin, l'augmentation de l'expression de HDAC2 a pu être montrée également dans le striatum dans lequel l'expression de la protéine est multipliée par 4 chez des rats s'auto-administrant de la cocaïne [$t(4) = -3,39$ $p = 0,028$] (Figure 24). L'ensemble de ces résultats est donc parfaitement cohérent au regard de la méthylation du gène par rapport à son expression.

DMR	Longueur (bp)	Densité de méthylation			Ratio	
		AA NaCl + véhicule	AA cocaïne + véhicule	AA cocaïne + 5-dAZA	AA cocaïne + véhicule / AA NaCl + véhicule	AA cocaïne +5-dAZA / AA cocaïne + véhicule
110814	558	8,87	9,18	9,50	1,03	1,04
110815	900	10,48	10,92	10,41	1,04	0,95
110816	380	13,75	10,45	13,64	0,76	1,30
110817	515	8,00	8,44	6,69	1,05	0,79
110818	561	10,69	10,81	7,82	1,01	0,72

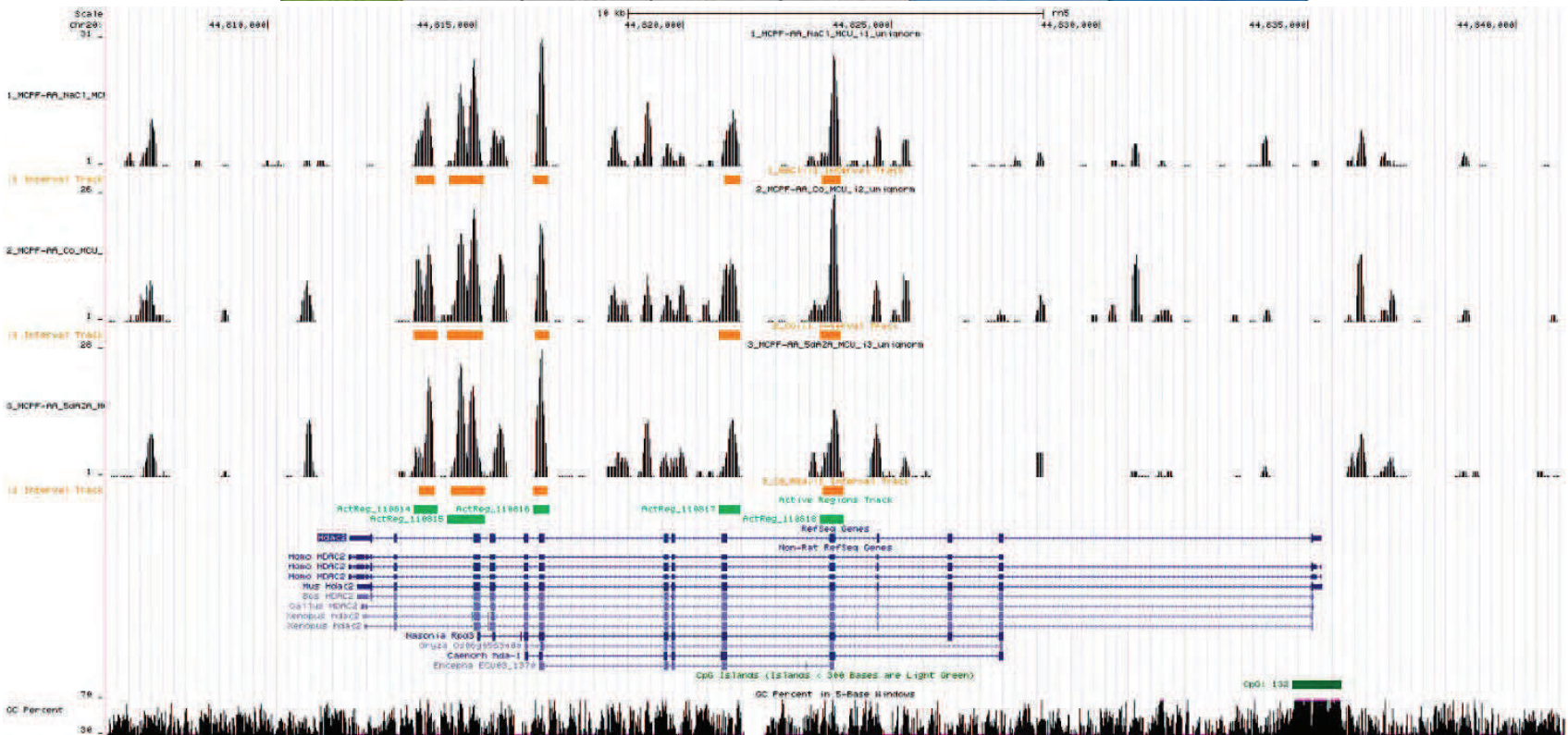


Figure 22 : Quantification et représentation graphique de la densité de méthylation des DMRs de *Hdac2*

La table indique le numéro des DMRs associées à *Hdac2*, la longueur de leurs séquences, la densité de méthylation mesurée pour chaque condition expérimentale et les ratios permettant de déterminer l'effet de l'AA de cocaïne (bleu clair) et celui de la 5-dAZA chez les animaux s'auto-administrant de la cocaïne (bleu foncé). La représentation graphique a été réalisée à l'aide du logiciel « UCSC Genome Browser assembly » suivant la norme RGSC Rnor_5.0/rn5. Le gène est symbolisé par la ligne bleue fléchée, les rectangles bleus indiquant les exons. *Hdac2* est transcrit sur le brin d'ADN 3'-5' ; l'exon 1 est à droite de la figure. Les gènes homologues sont affichés sous celui du rat. Les DMRs sont représentées par les barres horizontales vertes associées à un numéro précédé de « ActReg_ ». La densité de méthylation est représentée par les pics noirs situés au-dessus de chaque séquence méthylée. Les trois conditions expérimentales sont (de haut en bas) : AA NaCl + véhicule (1_MCPFF-AA_NaCl_MCU), AA cocaïne + véhicule (2_MCPFF-AA_Co_MCU) et AA cocaïne + 5-dAZA (3_MCPFF-AA_5dAZA_MCU). La présence d'un CGI au niveau du promoteur est symbolisée par la barre verte dans la ligne « CpG islands » et le nombre de CpG est indiqué à côté. Le contenu en GC de la séquence d'ADN est indiqué par la hauteur des pics en noir en bas de la figure.

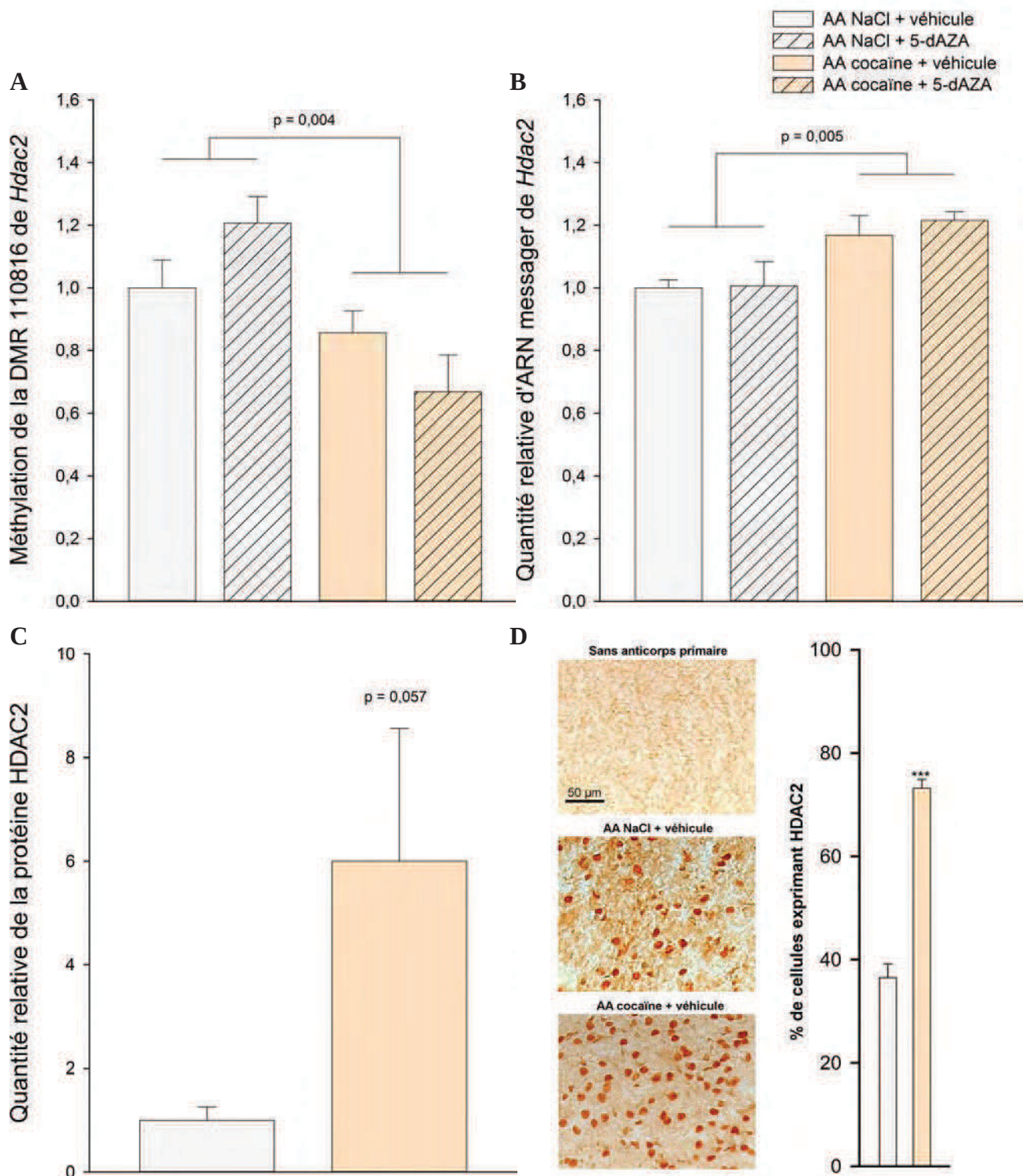


Figure 23 : L'AA de cocaïne diminue la méthylation et augmente l'expression de *Hdac2* dans le CPFm

Chaque barre représente la moyenne \pm SEM ($n=3/4$ rats par groupe). (A) Méthylation de la DMR 110816 mesurée par qPCR, ANOVA à deux facteurs et test post-hoc de Student-Newman-Keuls. (B) Expression relative d'ARNm mesurée par RT-qPCR, ANOVA à deux facteurs et test post-hoc de Student-Newman-Keuls. (C) Expression relative de la protéine mesurée par Western Blot, test de Mann-Whitney-Wilcoxon. (D) Marquage par immunohistochimie dans le cortex cingulaire antérieur [figure adaptée de (Host et al., 2011)], ANOVA à un seul facteur et test post-hoc de Student-Newman-Keuls, *** $p < 0,001$ vs AA NaCl + véhicule.

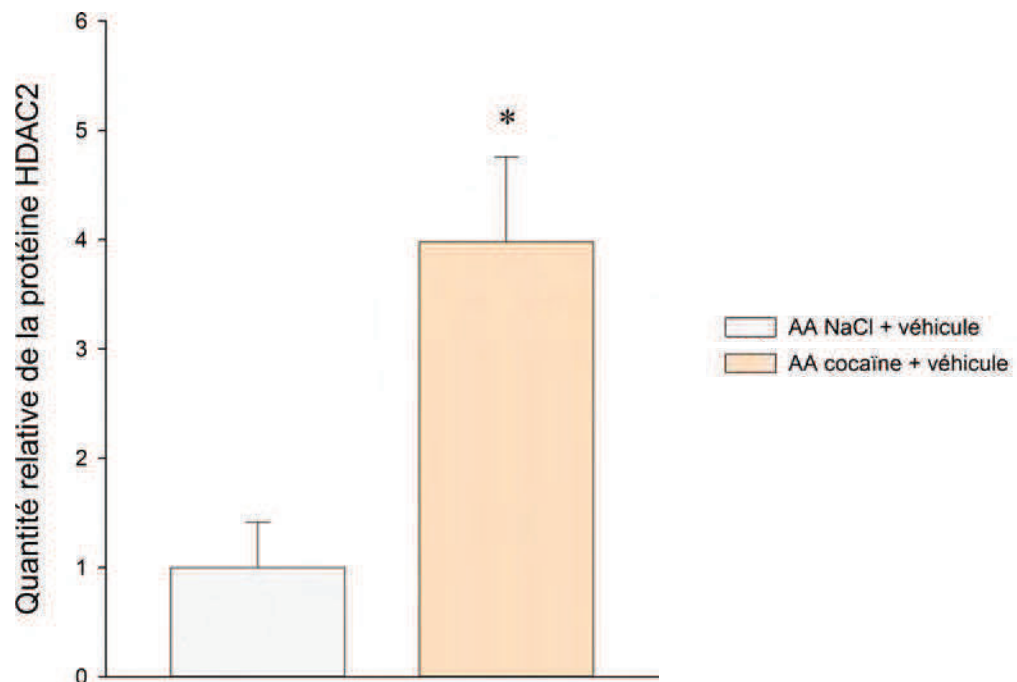


Figure 24 : L'AA de cocaïne augmente l'expression de *Hdac2* dans le striatum

Chaque barre représente la moyenne \pm SEM ($n=3$ rats par groupe) de l'expression de la protéine HDAC2 mesurée par Western Blot. Test *t* de Student, * $p < 0,05$ vs AA NaCl + véhicule.

B.2 Les autres gènes validés à la fois par méthylation différentielle et par expression

B.2.1 *Rock1*

ROCK1 est une sérine/thréonine kinase activée par la petite protéine G, RhoA. Elle est connue pour jouer un rôle clé dans la réorganisation du cytosquelette d'actine, d'où sa fonction dans les processus de migration cellulaire et de plasticité. Elle intervient également dans des processus plus intégrés tels que les processus mnésiques et les comportements alimentaires (Huang *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014). Situé sur le chromosome 18, le gène *Rock1* comporte 115 kb et compte 34 exons. Trois DMRs ont été retrouvées associées à ce gène, deux étant situées en 5' dans le promoteur et une DMR dans le gène (Figure 26). Dans ce cas, la densité de méthylation de la DMR intragénique (ActReg_79411) a pu être validée par qPCR. Dans l'analyse du méthylome, la DMR

79411 est déméthylée par la 5-dAZA chez les animaux s'auto-administrant la cocaïne. Cette diminution semble être retrouvée lors de la validation par qPCR sans, toutefois, être statistiquement significative (Figure 25A) [Effet principal de la 5-dAZA : $F(1, 11) = 0,42$; $p = 0,533$]. De même, l'expression du gène semble légèrement augmenter chez les rats s'auto-administrant de la cocaïne et traités par la 5-dAZA ; cependant, là encore, la différence n'est pas statistiquement significative (Figure 25B) [Effet principal de la 5-dAZA : $F(1, 8) = 0,60$; $p = 0,463$]. On peut souligner quand même la corrélation inverse entre méthylation de la région et transcription du gène.

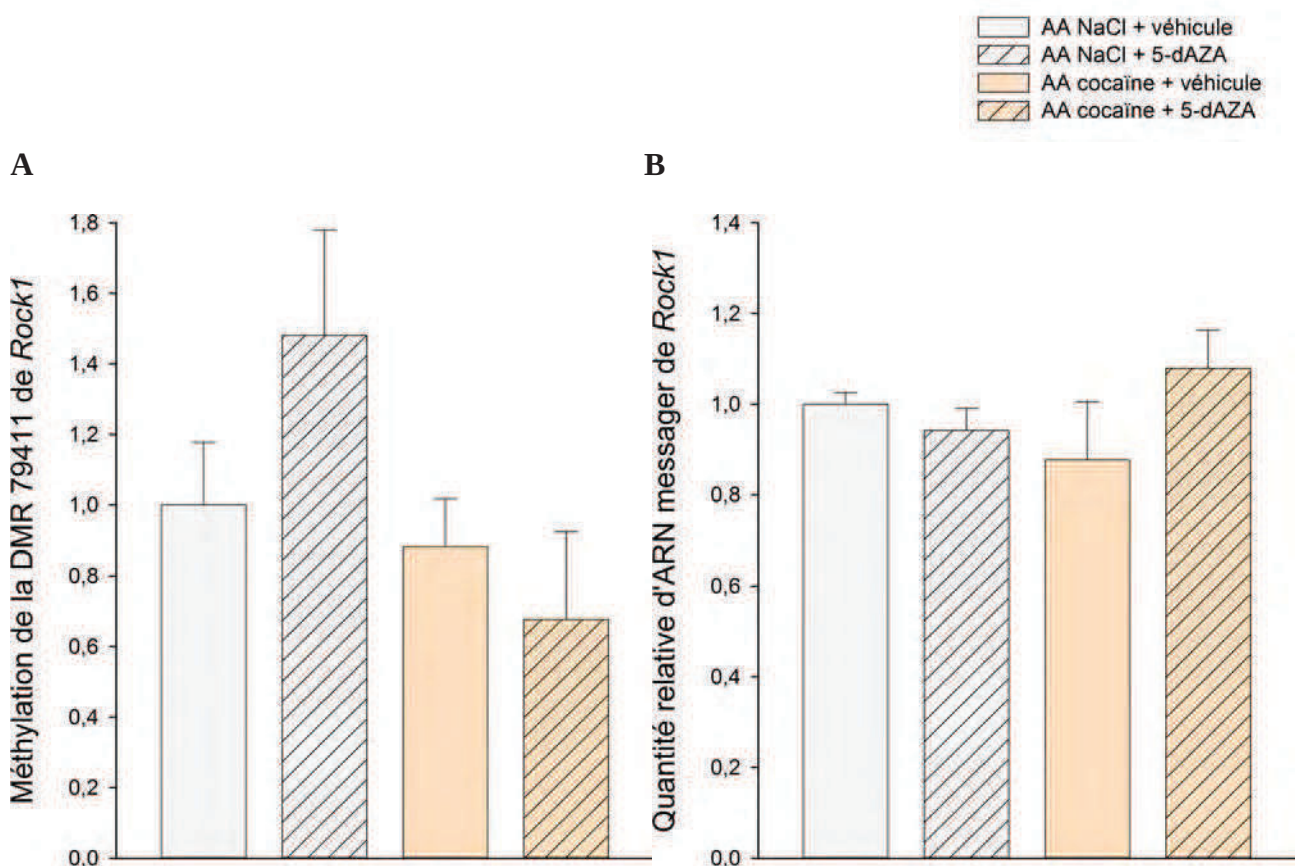


Figure 25 : La cocaïne et la 5-dAZA modifient peu la méthylation et l'expression de *Rock1* dans le CPFm

Chaque barre représente la moyenne \pm SEM ($n=3/4$ rats par groupe), ANOVA à deux facteurs et test post-hoc de Student-Newman-Keuls. **(A)** Méthylation de la DMR 79411 mesurée par qPCR. **(B)** Expression relative d'ARNm de *Rock1* mesurée par RT-qPCR.

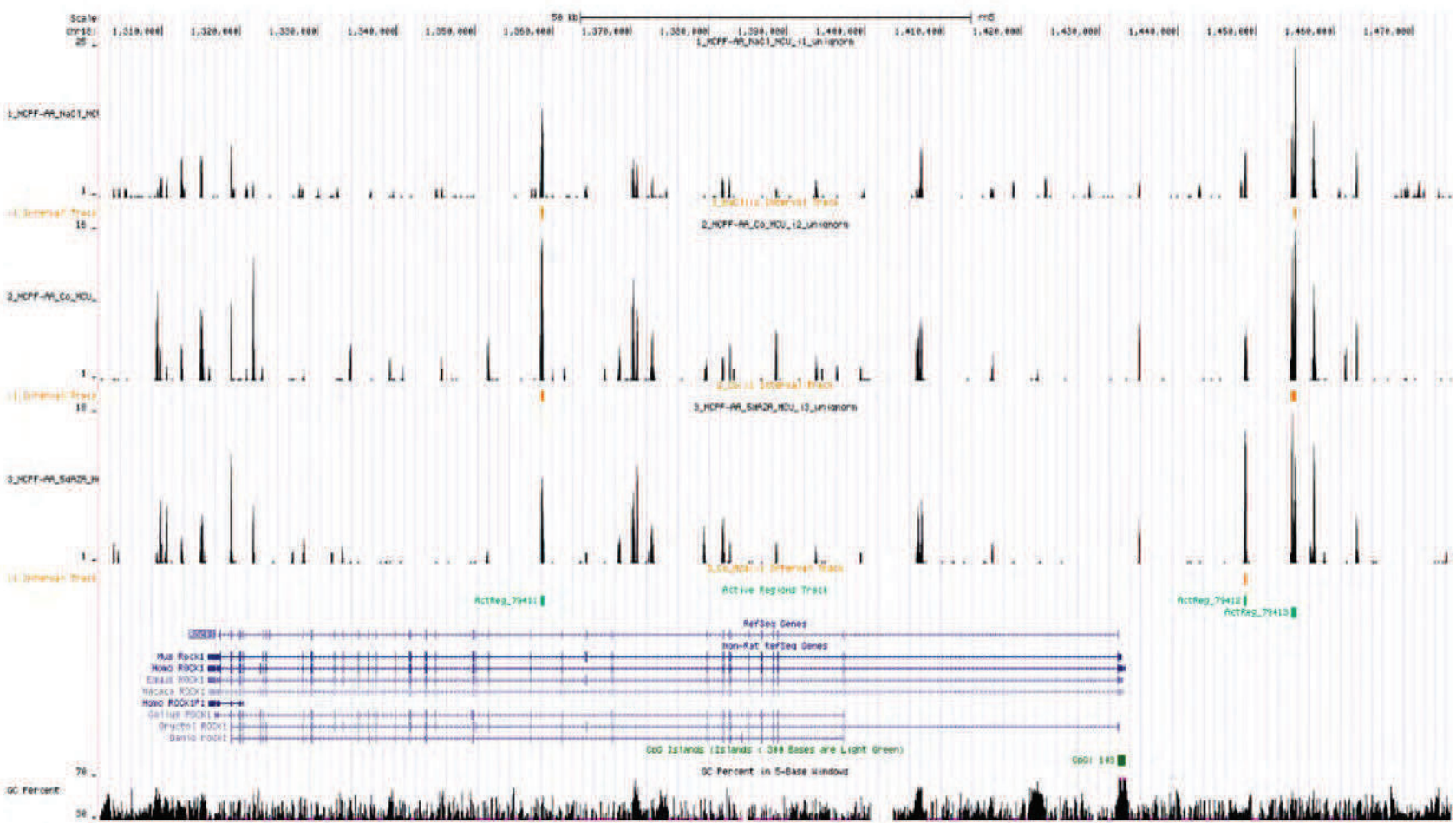


Figure 26 : Représentation des DMRs de *Rock1* issues de l'analyse du méthylome

La représentation graphique a été réalisée à l'aide du logiciel « UCSC Genome Browser assembly » suivant la norme RGSC Rnor_5.0/rn5. Le gène est symbolisé par la ligne bleue fléchée, les rectangles bleus indiquant les exons. *Rock1* est transcrit sur le brin d'ADN 3'-5' ; l'exon 1 est à droite de la figure. Les gènes homologues sont affichés sous celui du rat. Les DMRs sont représentées par les barres horizontales vertes associées à un numéro précédé de « ActReg_ ». Trois DMRs sont associées à *Rock1*, deux dans la région promotrice sur la droite de la figure et une DMR intragénique (ActReg_79411). La densité de méthylation est représentée par les pics noirs situés au-dessus de chaque séquence méthylée. Les trois conditions expérimentales sont (de haut en bas) : AA NaCl + véhicule (1_MCPF-AA_NaCl_MCU), AA cocaïne + véhicule (2_MCPF-AA_Co_MCU) et AA cocaïne + 5-dAZA (3_MCPF-AA_5dAZA_MCU). La présence d'un CGI au niveau du promoteur est symbolisée par la barre verte dans la ligne « CpG islands » et le nombre de CpG est indiqué à côté. Le contenu en GC de la séquence d'ADN est indiqué par la hauteur des pics en noir en bas de la figure.

B.2.2 *Cnrip1*

D'une longueur de seulement 29 kb et comportant 3 exons, *Cnrip1* code une protéine de 164 acides aminés, se liant au récepteur cannabinoïde CB1. CNRIP1 est connue pour interagir avec les systèmes dopaminergique et opioïde dans le SNC (Blume *et al.*, 2013). Notons que ce gène est fréquemment hyperméthylé dans certains cancers (Oster *et al.*, 2011; Bethge *et al.*, 2014; Chong *et al.*, 2014). Quatre DMRs ont été mises en évidence dans le méthylome, trois à l'extrémité 3' du gène et une dans le promoteur, la DMR 57083 (Figure 28). Dans l'analyse du méthylome, la DMR 57083 a été trouvée augmentée par la cocaïne et diminuée par la 5-dAZA chez ces animaux. Les mesures par qPCR ciblant cette région ont permis de valider l'analyse du méthylome (Figure 27A) [Interaction cocaïne x 5-dAZA : $F(1, 11) = 5,66$; $p = 0,037$]. La corrélation entre méthylation de la DMR du promoteur et expression du gène est cependant difficile à établir dans le cas de ce gène. En effet, la cocaïne, tout comme la 5-dAZA, augmente la transcription du gène (Figure 27B) [Effet principal de la cocaïne : $F(1, 9) = 9,62$; $p = 0,013$; effet principal de la 5-dAZA : $F(1, 9) = 8,10$; $p = 0,019$] ; ce qui signifie que seul l'effet de la 5-dAZA est en accord avec l'idée conventionnelle selon laquelle la déméthylation du promoteur d'un gène est corrélée à sa transcription accrue. Il faut noter que la 5-dAZA seule ne modifie pas la méthylation de cette région promotrice.

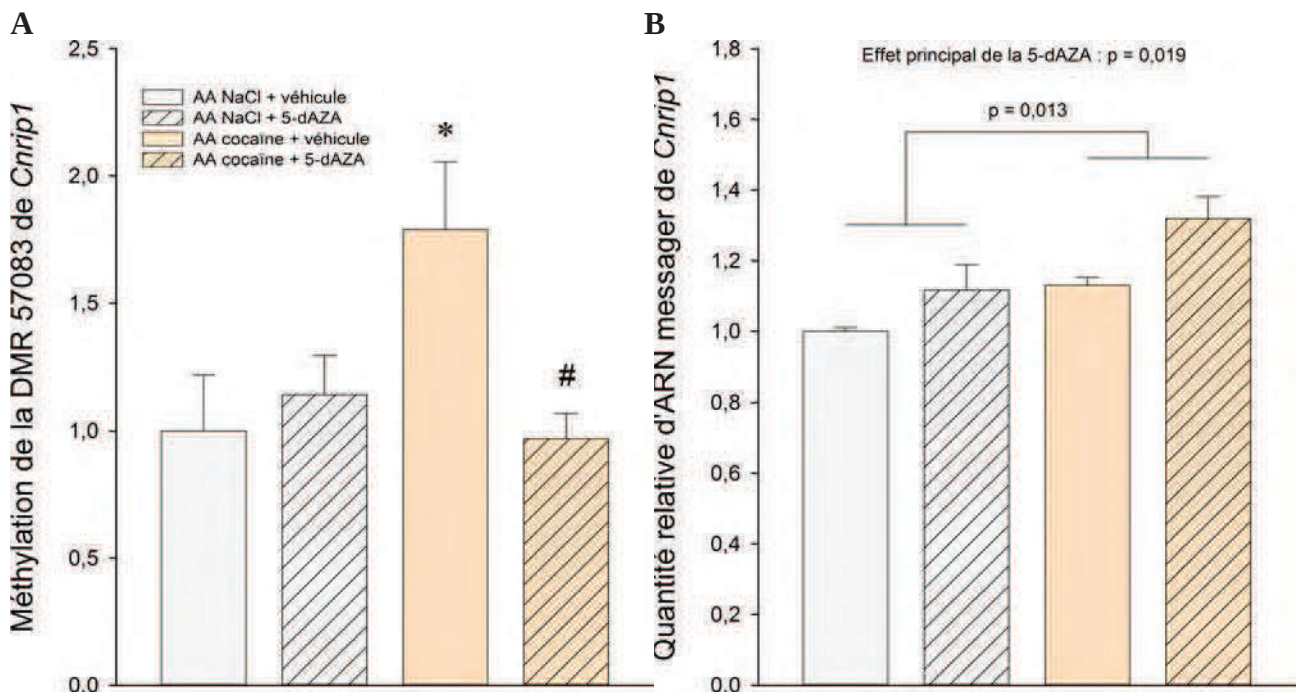


Figure 27 : La cocaïne et la 5-dAZA régulent la méthylation et l'expression de *Cnrip1* dans le CPFm

Chaque barre représente la moyenne \pm SEM ($n=3/4$ rats par groupe), ANOVA à deux facteurs et test post-hoc de Student-Newman-Keuls. **(A)** Méthylation de la DMR 57083 mesurée par qPCR ; * $p < 0,05$ vs AA NaCl + véhicule, # $p < 0,05$ vs AA cocaïne + véhicule. **(B)** Expression relative d'ARNm de *Cnrip1* mesurée par RT-qPCR.

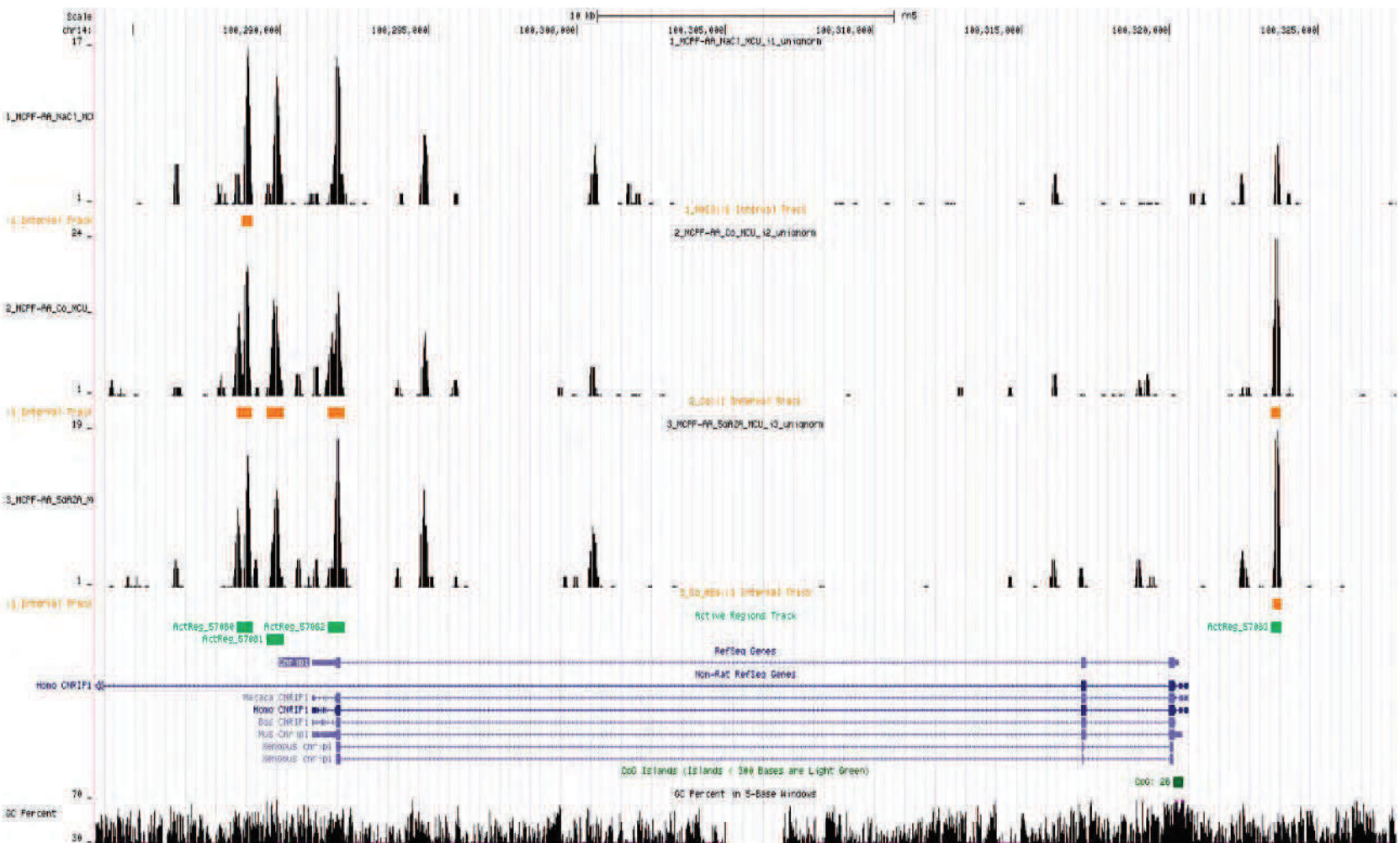


Figure 28 : Représentation des DMRs de *Cnrip1* issues de l'analyse du méthylome

La représentation graphique a été réalisée à l'aide du logiciel « UCSC Genome Browser assembly » suivant la norme RGSC Rnor_5.0/rn5. Le gène est symbolisé par la ligne bleue fléchée, les rectangles bleus indiquant les exons. *Cnrip1* est transcrit sur le brin d'ADN 3'-5' ; l'exon 1 est à droite de la figure. Les gènes homologues sont affichés sous celui du rat. Les DMRs sont représentées par les barres horizontales vertes associées à un numéro précédé de « ActReg_ ». Quatre DMRs sont associées à *Cnrip1*, une dans la région promotrice sur la droite de la figure (ActReg_57083) et trois DMRs en 3' du gène sur la gauche de la figure. La densité de méthylation est représentée par les pics noirs situés au-dessus de chaque séquence méthylée. Les trois conditions expérimentales sont (de haut en bas) : AA NaCl + véhicule (1_MCPF-AA_NaCl_MCU), AA cocaïne + véhicule (2_MCPF-AA_Co_MCU) et AA cocaïne + 5-dAZA (3_MCPF-AA_5dAZA_MCU). La présence d'un CGI au niveau du promoteur est symbolisée par la barre verte dans la ligne « CpG islands » et le nombre de CpG est indiqué à côté. Le contenu en GC de la séquence d'ADN est indiqué par la hauteur des pics en noir en bas de la figure.

B.3 Les gènes déjà connus pour être régulés par méthylation

B.3.1 *Reln*

La reeline est une protéine de la matrice extracellulaire jouant un rôle fondamental dans la plasticité synaptique du cerveau adulte (Stranahan *et al.*, 2013). Situé sur le chromosome 4, le gène *Reln* est un gène particulièrement long (426 kb) comptant 65 exons. Le gène *Reln* est connu pour être régulé par la méthylation de l'ADN (voir Contexte Scientifique Chapitre II : C.9). L'analyse du méthylome montre que ce gène est particulièrement méthylé puisque les résultats nous indiquent que 260 DMRs sont comprises dans ce gène, ce qui en fait un de ceux comptant le plus grand nombre de régions différentiellement méthylées dans nos conditions expérimentales. L'analyse de l'expression par RT-qPCR ne montre aucune régulation de la quantité de transcrite dans le CPFm (Figure 29A), ni par la cocaïne [$F(1, 9) = 1,85$; $p = 0,207$], ni par la 5-dAZA [$F(1, 9) = 0,87$; $p = 0,375$], ce qui est en accord avec les résultats précédents de l'équipe (Host *et al.*, 2010). En revanche, la 5-dAZA augmente l'expression du gène dans le striatum (Figure 29B) [Effet principal de la 5-dAZA : $F(1, 9) = 6,53$; $p = 0,031$], ce qui soutient le fait qu'un gène connu pour être régulé par méthylation puisse être surexprimé par l'action d'un agent déméthylant.

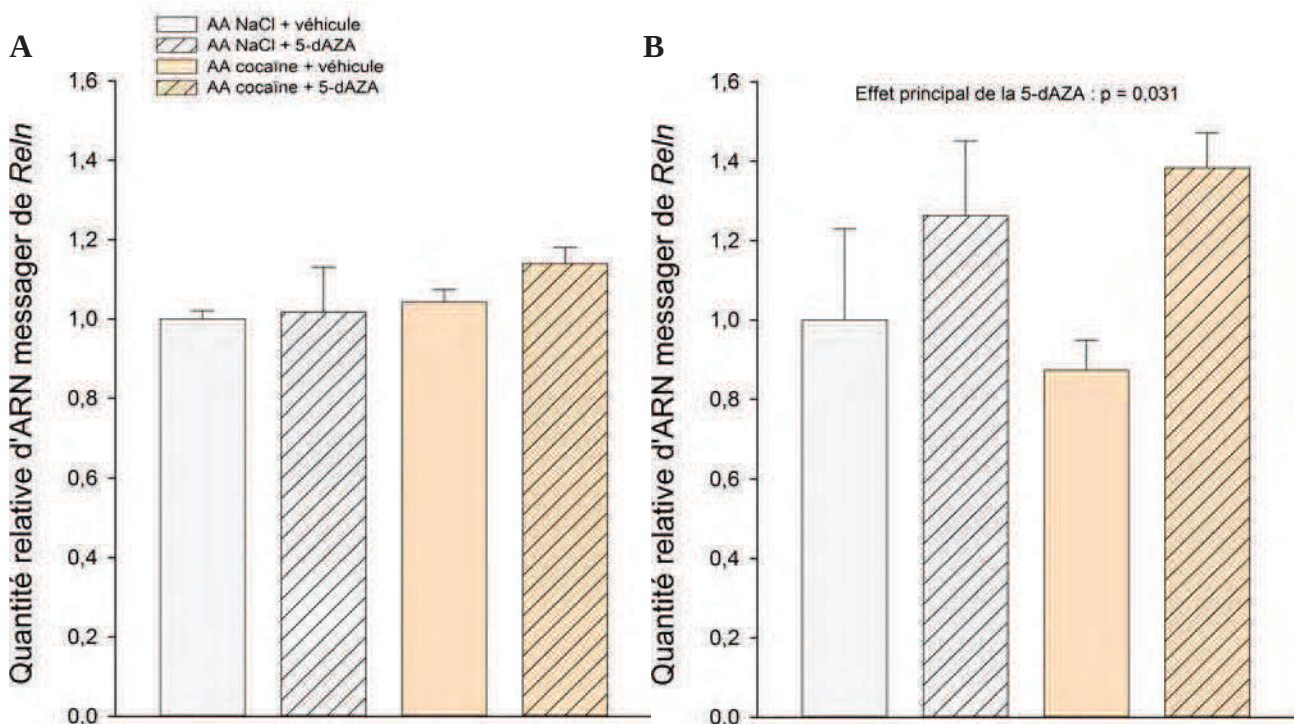


Figure 29 : La 5-dAZA augmente l'expression de *Reln* dans le striatum et non dans le CPFm

Chaque barre représente la moyenne \pm SEM ($n=3/4$ rats par groupe) de l'expression relative d'ARNm mesurée par RT-qPCR dans le CPFm (A) et dans le striatum (B). ANOVA à deux facteurs et test post-hoc de Student-Newman-Keuls.

B.3.2 Cdkl5

Ayant un rôle dans les phénomènes de plasticité morphologique des neurones, cette sérine/thréonine kinase est également impliquée dans des cas de retards mentaux (Kilstrup-Nielsen *et al.*, 2012). *Cdkl5* (Cyclin-dependent kinase-like 5) est réprimé par méthylation par la cocaïne dans le cortex cingulaire antérieur et le striatum mais également induit par la 5-dAZA (Carouge *et al.*, 2010). Conformément à ces résultats précédents de l'équipe, nous avons retrouvé dans notre analyse du méthylome une DMR hyperméthylée par la cocaïne et déméthylée par la 5-dAZA. Cette DMR est la seule associée au gène et est située dans sa partie 3'.

B.4 Gènes « validés » uniquement par leurs niveaux d'expression

Puisque la conception et la validation des amorces de qPCR pour beaucoup de DMRs n'ont pas été possibles, certains gènes n'ont pu être validés qu'en analysant l'expression de l'ARN messager.

B.4.1 Arhgef9, un gène déméthylé et induit par la cocaïne

D'une longueur de 178 kb et comportant 13 exons, *Arhgef9* (Cdc42 guanine nucleotide exchange factor) code une protéine, la collybistine, qui active la Rho GTPase Cdc42. La collybistine est impliquée dans la plasticité morphologique des synapses GABAergiques (Körber *et al.*, 2012; Patrizi *et al.*, 2012). *Arhgef9* possède une seule DMR, située dans le second intron, qui est hypométhylée par la cocaïne (Figure 30). L'expression de son messenger est augmentée par la drogue (Figure 31) [$F(1, 9) = 12,93$; $p = 0,006$]. Ainsi, dans le cas de ce gène, comme pour *Hdac2*, la déméthylation d'une DMR intragénique par la cocaïne est corrélée à une transcription accrue du gène.

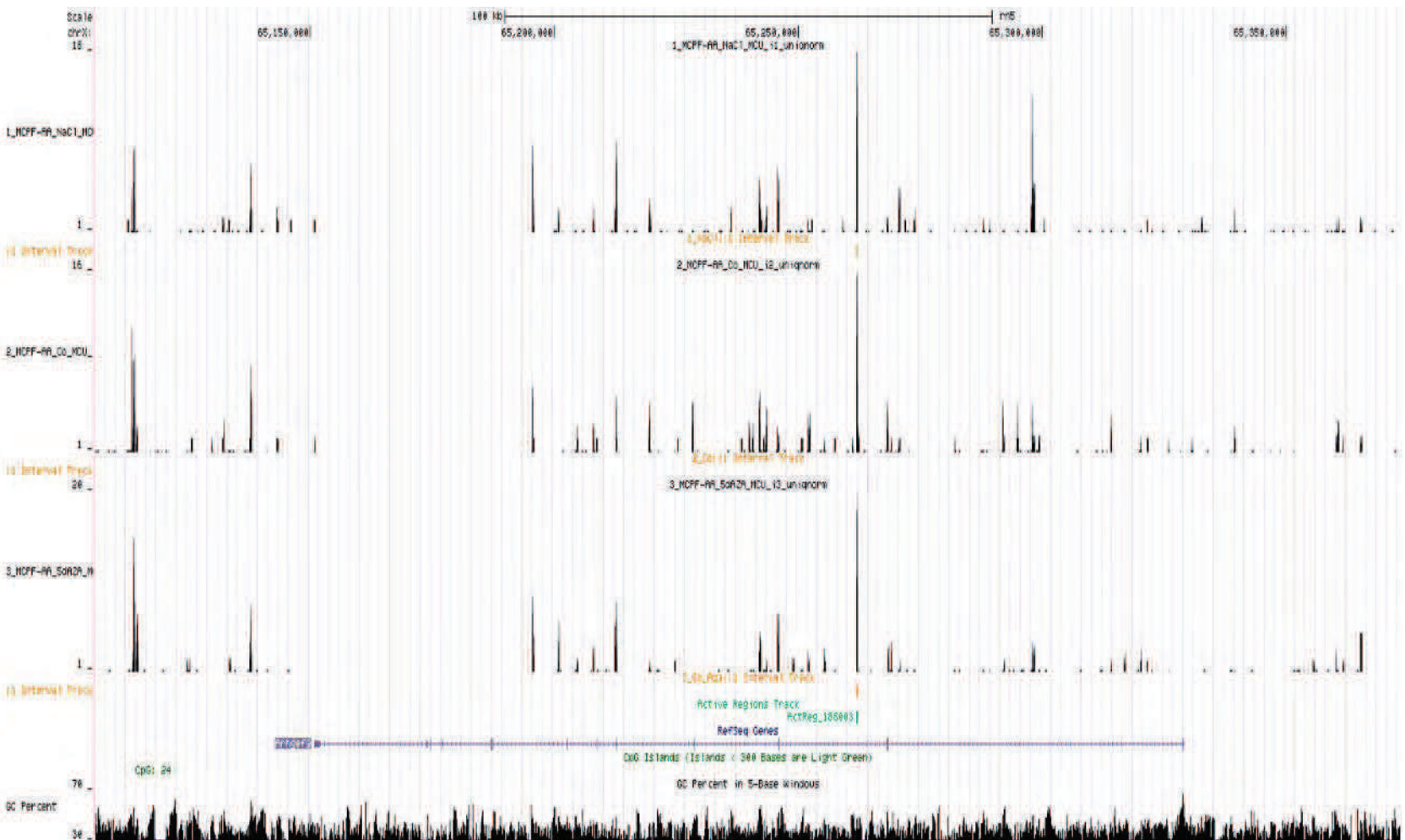


Figure 30 : Représentation de la DMR de *Arhgef9* issue de l'analyse du méthylome

La représentation graphique a été réalisée à l'aide du logiciel « UCSC Genome Browser assembly » suivant la norme RGSC Rnor_5.0/rn5. Le gène est symbolisé par la ligne bleue fléchée, les rectangles bleus indiquant les exons. *Arhgef9* est transcrit sur le brin d'ADN 3'-5' ; l'exon 1 est à droite de la figure. La DMR, située dans le second intron, est représentée par la barre horizontale verte (*ActReg_188003*). La densité de méthylation est représentée par les pics noirs situés au-dessus de chaque séquence méthylée. Les trois conditions expérimentales sont (de haut en bas) : AA NaCl + véhicule (1_MCPF-AA_NaCl_MCU), AA cocaïne + véhicule (2_MCPF-AA_Co_MCU) et AA cocaïne + 5-dAZA (3_MCPF-AA_5dAZA_MCU). La présence d'un CGI en 3' du gène est symbolisée par la barre verte dans la ligne « CpG islands » et le nombre de CpG est indiqué à côté. Le contenu en GC de la séquence d'ADN est indiqué par la hauteur des pics en noir en bas de la figure.

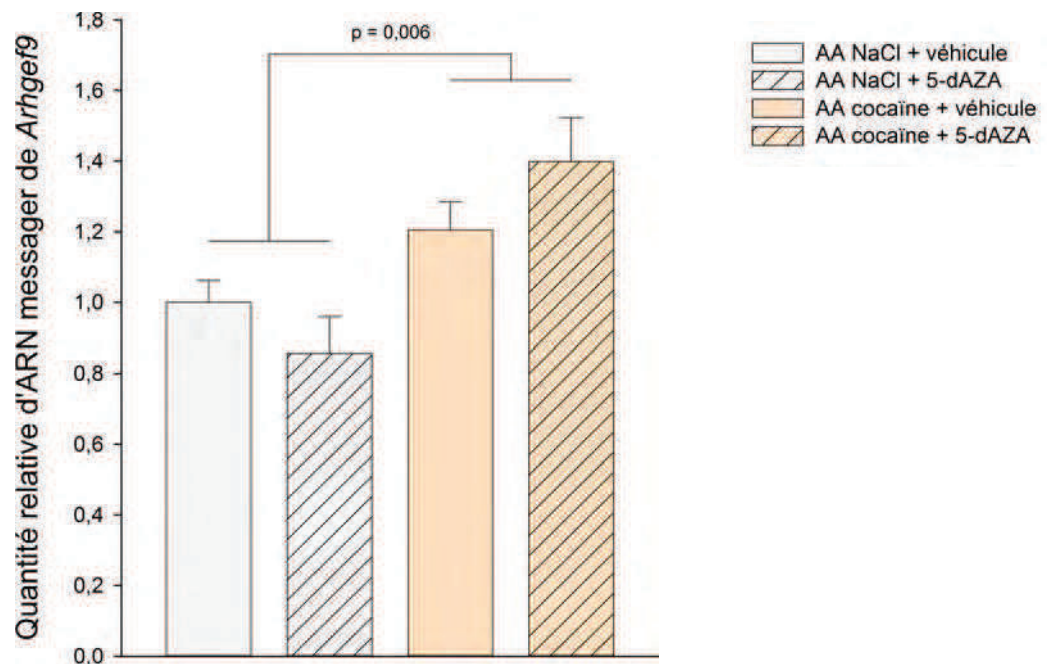


Figure 31 : L'AA de cocaïne augmente l'expression de *Arhgef9* dans le CPFm

Chaque barre représente la moyenne \pm SEM ($n=3/4$ rats par groupe) de l'expression relative d'ARNm mesurée par RT-qPCR. ANOVA à deux facteurs et test post-hoc de Student-Newman-Keuls.

B.4.2 Le cas de *Pak3*, *Agap2* et *Ip6k2* : des DMRs dont le sens de variation de la méthylation est opposé

Parfois, la corrélation entre méthylation et expression ne peut être déterminée car le gène différentiellement méthylé possède plusieurs DMRs dont le sens de régulation de la méthylation n'est pas le même. C'est le cas de *Pak3*, *Agap2* et *Ip6k2*.

PAK3 (p21-activated kinase 3) est une sérine/thréonine kinase, effecteur des Rho-GTPases Rac et Cdc42. Elle joue un rôle fondamental dans la morphologie des épines dendritiques et est impliquée dans un type de retard mental lié au chromosome X (Kreis *et al.*, 2007; Dubos *et al.*, 2012). La transcription de *Pak3* est accrue par la cocaïne (Figure 32A) [$F(1, 8) = 5,57$; $p = 0,046$]. Or, *Pak3* possède deux DMRs situées dans des introns dont l'une est déméthylée et l'autre hyperméthylée par la cocaïne. Dans ce cas précis, nous ne sommes donc pas en mesure d'établir une corrélation entre la méthylation du gène et son expression.

AGAP2 (Arf GTPase-activating protein 2) est une protéine régulant le trafic de récepteurs à la membrane, tels que les récepteurs AMPA au glutamate ou les récepteurs β 2 adrénergiques (Chan *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2013). La 5-dAZA induit une augmentation de la transcription de *Agap2* à la limite de la significativité (Figure 32B) [$F(1, 9) = 4,81$; $p = 0,056$]. Or, *Agap2* possède également deux grandes DMRs intragéniques dont l'une est méthylée et l'autre hypométhylée par la 5-dAZA. A l'instar de *Pak3*, la corrélation entre méthylation des DMRs et expression du gène ne peut être établie.

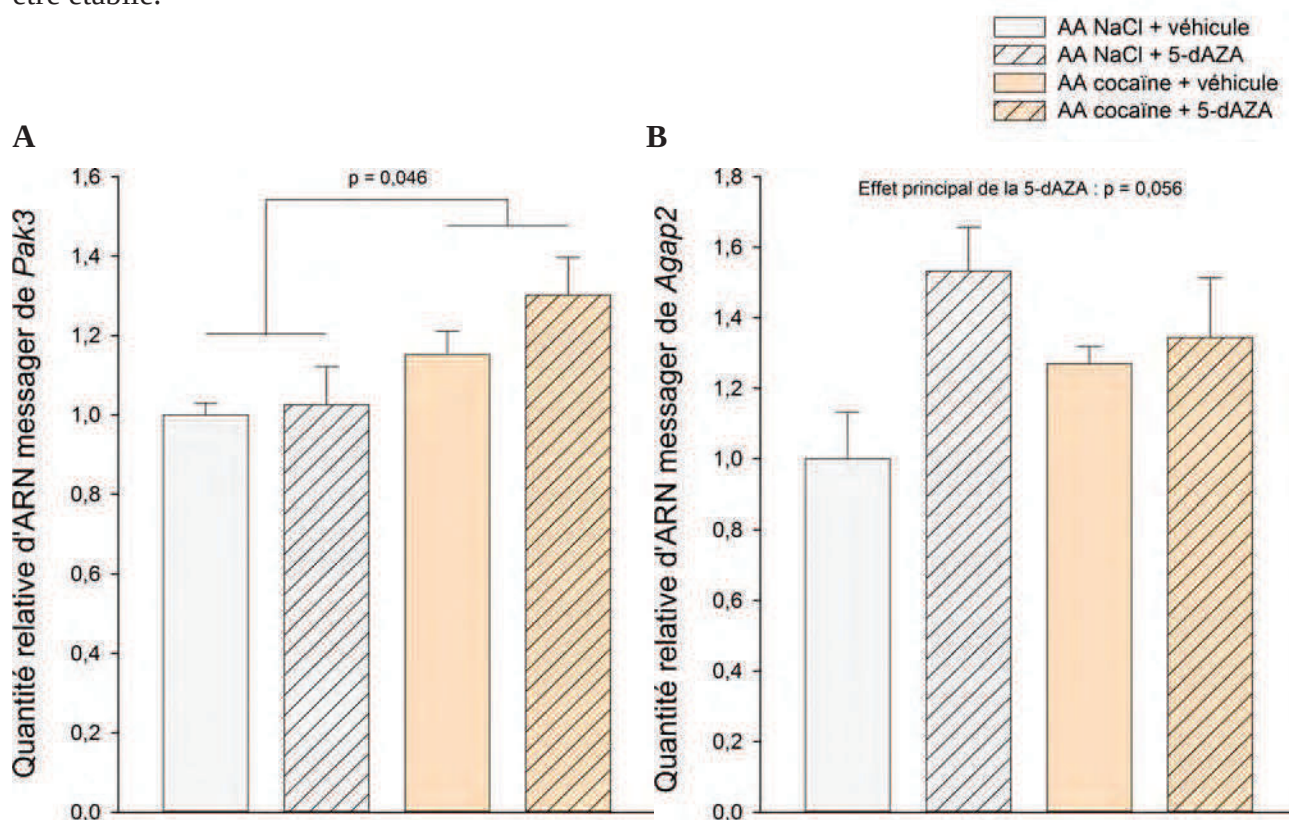


Figure 32 : Régulation de l'expression de *Pak3* et *Agap2* dans le CPFm

Chaque barre représente la moyenne \pm SEM ($n=3/4$ rats par groupe) de l'expression relative d'ARNm mesurée par RT-qPCR pour *Pak3* (A) et *Agap2* (B). ANOVA à deux facteurs et test post-hoc de Student-Newman-Keuls.

IP6K2 (inositol hexakisphosphate kinase-2) est une protéine impliquée dans le développement du SNC (Sarmah et Wentz, 2010), mais également un acteur majeur de la mort cellulaire (Rao *et al.*, 2014). Dans l'analyse du méthylome, 5 DMRs ont été retrouvées associées au gène *Ip6k2*, une DMR dans le gène, non modifiée par la cocaïne, et 4 DMRs en 3' du gène dont deux sont hypométhylées par la cocaïne et deux autres hyperméthylées. L'expression du gène *Ip6k2* est induite

par la cocaïne (Figure 33) [$F(1, 9) = 22,15$; $p = 0,001$]. Ici encore, on ne peut conclure quant à une éventuelle corrélation entre méthylation des DMRs et expression du gène.

Ainsi dans le cas de *Pak3*, *Agap2* et *Ip6k2*, plusieurs DMRs sont associées aux gènes et les traitements induisent des modifications de la méthylation différentes selon la position des DMRs. On ne peut alors associer la variation de la méthylation de l'une ou l'autre des DMRs à la transcription accrue de ces gènes.

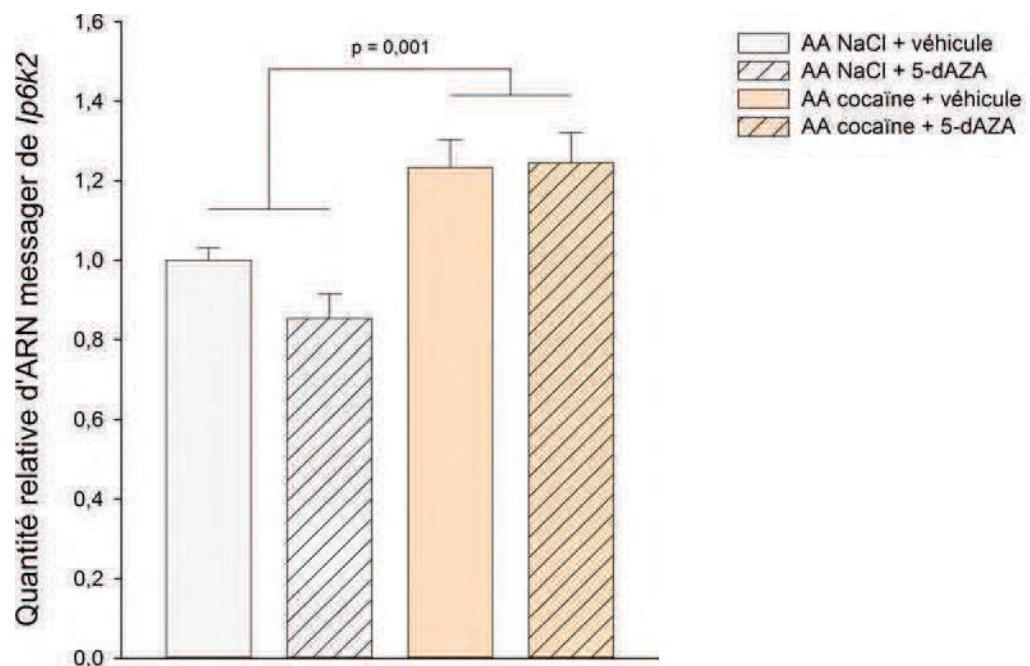


Figure 33 : L'AA de cocaïne augmente l'expression de *Ip6k2* dans le CPFm

Chaque barre représente la moyenne \pm SEM ($n=3/4$ rats par groupe) de l'expression relative d'ARNm mesurée par RT-qPCR. ANOVA à deux facteurs et test post-hoc de Student-Newman-Keuls.

B.5 Gènes non différentiellement exprimés

Une partie des gènes différentiellement méthylés tels que *Arf6*, *Arhgef6*, *Lcor*, *Mapk6* ou *Tet1* ne voient leur expression modifiée ni par la cocaïne, ni par la 5-dAZA malgré des modifications parfois colossales de la méthylation des DMRs qui leur sont associées. L'exemple le plus flagrant concerne le gène *Arf6*. ARF6 (ADP-ribosylation factor 6) est une protéine régulant simultanément la dynamique du cytosquelette d'actine et le trafic membranaire comme celui des récepteurs AMPA après potentialisation à long terme des synapses glutamatergiques (Jaworski, 2007; Oku et Huganir, 2013). Ce cas est particulièrement intéressant puisque la DMR unique qui lui est associée, située

dans un CGI dans le promoteur, est hypométhylée par la cocaïne mais surtout totalement déméthylée par la 5-dAZA (Figure 35). Pourtant, en réponse à ces changements drastiques de méthylation, on n'observe pas de modification de l'expression du gène (Figure 34) [Effet principal de la cocaïne : $F(1, 9) = 2,83$; $p = 0,127$; effet principal de la 5-dAZA : $F(1, 9) = 2,81$; $p = 0,128$]. Ainsi, bien que la corrélation méthylation / répression de la transcription soit classiquement admise dans le cas de promoteurs riches en GC, l'exemple du gène *Arf6* illustre bien le fait que la vision conventionnelle selon laquelle la méthylation de l'ADN est une marque répressive de la transcription n'est pas une règle immuable.

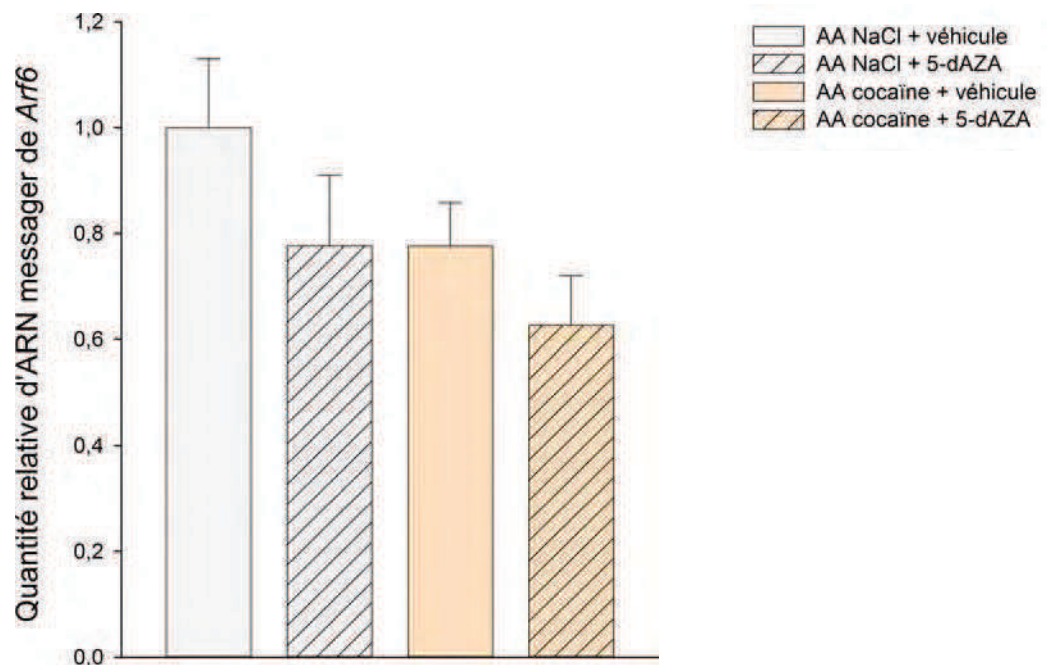


Figure 34 : La cocaïne et la 5-dAZA ne modifient pas l'expression de *Arf6* dans le CPFm

Chaque barre représente la moyenne \pm SEM ($n=3/4$ rats par groupe) de l'expression relative d'ARNm de *Arf6* mesurée par RT-qPCR. ANOVA à deux facteurs et test post-hoc de Student-Newman-Keuls.

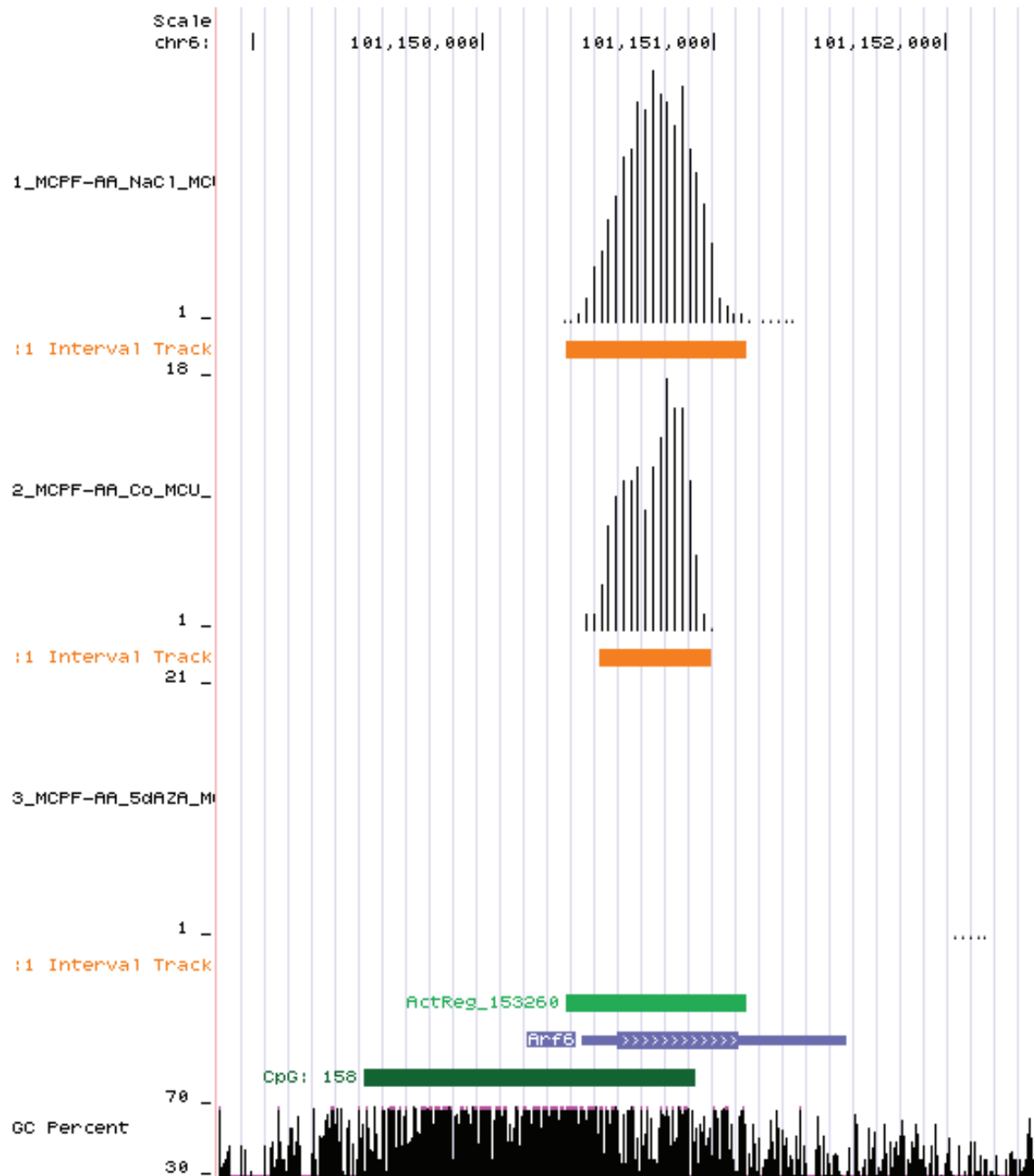


Figure 35 : Représentation de la DMR de *Arf6* issue de l'analyse du méthylome

La représentation graphique a été réalisée à l'aide du logiciel « UCSC Genome Browser assembly » suivant la norme RGSC Rnor_5.0/rn5. Le gène est symbolisé par la ligne bleue fléchée, le rectangle bleu indiquant ici deux exons en réalité. *Arf6* est transcrit sur le brin d'ADN 5'-3'. La densité de méthylation est représentée par les pics noirs situés au-dessus de chaque séquence en haut de la figure. Les trois conditions expérimentales sont (de haut en bas) : AA NaCl + véhicule (1_MCPFF-AA_NaCl_MCU), AA cocaïne + véhicule (2_MCPFF-AA_Co_MCU) et AA cocaïne + 5-dAZA (3_MCPFF-AA_5dAZA_MCU). La présence d'un CGI au niveau du promoteur est symbolisée par la barre verte en bas de la figure et le nombre de CpG est indiqué à côté. Le contenu en GC de la séquence d'ADN est indiqué par la hauteur des pics en noir en bas de la figure. **La DMR (barre horizontale verte, ActReg_153260), recouvrant partiellement le promoteur proximal, le CGI et la totalité de la séquence codante, est hypométhylée par la cocaïne et totalement déméthylée par la 5-dAZA.**

Discussion

Générale

Chapitre I : Méthylation de l'ADN et comportement de prise de drogue

A - Les inhibiteurs de DNMTs augmentent les propriétés renforçantes de la cocaïne

Nous démontrons ici que l'inhibition des DNMTs par la 5-dAZA ou la zébularine induit une hausse de la consommation de cocaïne dans le protocole de FR. Cet accroissement est observable à différentes doses de cocaïne dans un protocole de dose-réponse intra-session. La courbe dose-réponse de cocaïne se présente sous la forme d'un U inversé, qu'elle soit faite sur différentes sessions d'AA, ou au sein de la même session. On considère qu'un déplacement vers le haut de cette courbe en cloche signifie que les propriétés renforçantes de la drogue ont été accrues par le traitement pharmacologique (LeSage *et al.*, 1999). Dans des procédures où la dose-réponse de cocaïne est établie à travers différentes sessions et non par paliers à l'intérieur même de chaque session, le pic de la courbe en U se situe aux alentours de 0,3 mg/kg/injection [(Mierzejewski *et al.*, 2003) et données non publiées de l'équipe, Romieu P.], ce qui indique que la hausse de consommation observée à la dose de 0,33 mg/kg/injection sous le protocole de FR traduit un déplacement du pic de la courbe en U inversé vers le haut. Dans des procédures de dose-réponse de cocaïne au sein d'une même session d'AA, le pic de la courbe se situe aux alentours de 0,1 mg/kg/injection (Schenk, 2002; Grakalic *et al.*, 2010). Dans notre expérience de dose-réponse de cocaïne intra-session, le nombre d'injections de cocaïne augmente chez les animaux traités par la 5-dAZA à la dose de 0,125 mg/kg/injection, confirmant que l'inhibition des DNMTs entraîne un déplacement de la courbe en U inversé vers le haut. Ainsi, inhiber l'activité enzymatique de méthylation de l'ADN revient à augmenter les propriétés renforçantes de la cocaïne. Nous montrons également que cette augmentation des propriétés renforçantes de la drogue est dépendante de la dose d'inhibiteurs, puisqu'une dose dix fois plus faible n'induit pas de hausse significative de la consommation sous le protocole de FR.

Par contre, nous n'avons trouvé aucun effet des inhibiteurs de DNMTs sur la motivation des rats pour la drogue sous le protocole de PR, ni sur le renforcement du comportement de recherche de drogue après une période de sevrage. Ainsi, contrairement à l'inhibition des HDACs dans des conditions expérimentales similaires (contexte et paramètres des sessions d'AA de cocaïne) (Romieu *et al.*, 2008, 2011), les modifications de l'état de méthylation de l'ADN ne semblent jouer

Chapitre I : Méthylation de l'ADN et comportement de prise de drogue

un rôle que dans le comportement de consommation de cocaïne, sans affecter la motivation des animaux pour la drogue, ni la rechute. Par ailleurs, les inhibiteurs de HDACs diminuent les propriétés renforçantes de la cocaïne (Romieu *et al.*, 2008), alors que les inhibiteurs de DNMTs les augmentent. Cet effet inverse sur le comportement de prise de drogue est, dans une certaine mesure, étonnant dans le sens où l'inhibition des HDACs comme celle des DNMTs est censée conduire à la formation d'une chromatine décondensée, donc à l'activation de la transcription. Notons qu'un effet contraire des deux types d'inhibiteurs a déjà été démontré dans des tests comportementaux visant à évaluer la mémoire. Dans ce cas, les inhibiteurs de DNMTs bloquent la consolidation mnésique alors que les inhibiteurs de HDACs la fortifient (Miller *et al.*, 2008; Maddox et Schafe, 2011; Monsey *et al.*, 2011). Ainsi, bien que les effets des inhibiteurs de HDACs et de DNMTs sur la méthylation de l'ADN et l'acétylation des histones puissent se recouper (voir Contexte Scientifique Chapitre II : C.9), l'ensemble de ces résultats suggère que ce n'est pas la méthylation globale mais bien des gènes particuliers qui sont incriminés.

Les travaux exposés dans cette thèse sont novateurs, dans le sens où aucune publication à ce jour n'a démontré l'implication de la méthylation de l'ADN dans le comportement de prise volontaire de cocaïne chez l'animal. Quelques travaux démontrent l'implication de protéines de liaison à l'ADN méthylé comme MeCP2 dans la prise de cocaïne, et seuls trois articles font état de l'utilisation d'inhibiteurs de DNMTs dans le conditionnement de préférence de place ou la sensibilisation comportementale. Nous avons montré que MeCP2 était induit dans le CPF et le striatum par la prise de cocaïne, qu'elle soit volontaire ou non (Cassel *et al.*, 2006; Host *et al.*, 2011; Pol Bodetto *et al.*, 2014). L'inhibition de l'expression de cette protéine de liaison à l'ADN méthylé dans le striatum dorsal diminue la consommation de cocaïne des rats (Im *et al.*, 2010). A l'inverse, la même inhibition de l'expression de MeCP2 dans le NAc (striatum ventral) augmente la préférence de place aux amphétamines (Deng *et al.*, 2010). Cet effet contradictoire selon la structure ciblée se vérifie également avec l'utilisation d'inhibiteurs de DNMTs. En effet, l'injection de RG108 dans le NAc augmente la sensibilisation locomotrice à la cocaïne (LaPlant *et al.*, 2010), alors que l'injection ICV de zébularine diminue cette même sensibilisation comportementale (Anier *et al.*, 2010). Injectée dans l'hippocampe ou dans le cortex prélimbique (une sous-région du CPFm), la 5-dAZA empêche respectivement l'installation ou le rappel d'une préférence de place à la cocaïne (Han *et al.*, 2010), alors que le RG108 injecté dans le NAc augmente cette même préférence de place (LaPlant *et al.*, 2010). Il faut préciser que les inhibiteurs de DNMTs utilisés présentent des modes d'action différents : alors que la zébularine et la 5-dAZA sont des analogues de la 5-mC pouvant s'incorporer

Chapitre I : Méthylation de l'ADN et comportement de prise de drogue

dans l'ADN, le RG108 agit sur les DNMTs comme un inhibiteur enzymatique classique. La zébularine et la 5-dAZA elles-mêmes agissent différemment. La 5-dAZA est un désoxyribonucléotide connu pour inhiber seulement les DNMTs de façon irréversible, alors que la zébularine est un ribonucléotide inhibant les DNMTs de manière réversible, mais aussi la cytidine désaminase, une enzyme de la voie secondaire de synthèse des pyrimidines. Cette moindre spécificité de la zébularine pourrait expliquer le fait que la hausse de consommation de cocaïne dans le protocole de FR soit moins importante chez les animaux traités par la zébularine que chez les animaux traités par la 5-dAZA. De plus, bien que la cytidine désaminase n'appartienne pas à la famille AID/APOBEC, sans doute impliquée dans la déméthylation active de l'ADN (Morgan *et al.*, 2004; Popp *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2011b), ces enzymes font partie de la superfamille des cytidines désaminases qui possèdent toutes un domaine catalytique conservé liant un ion zinc (cd01283). Il est donc possible que la zébularine, en se fixant dans cette poche catalytique (Betts *et al.*, 1994; Xiang *et al.*, 1995), puisse également inhiber la famille AID/APOBEC, auquel cas cet inhibiteur de DNMTs empêcherait la déméthylation, expliquant un effet moindre par rapport à la 5-dAZA concernant l'inhibition de la méthylation de l'ADN et l'augmentation de la consommation de cocaïne sous le protocole de FR. Cependant, les différences entre les deux traitements par les inhibiteurs sous le protocole de FR n'étant pas significatives, il sera nécessaire d'établir une courbe dose-réponse de cocaïne chez des animaux traités par la zébularine afin de comparer réellement l'efficacité des deux types d'inhibiteurs sur les propriétés renforçantes de la drogue.

B - Critiques

Les inhibiteurs de DNMTs ont des effets comportementaux sur des processus intégrés pouvant participer à la prise volontaire de drogue tels que la mémoire ou l'état émotionnel.

Ainsi, injectés dans diverses structures cérébrales, les inhibiteurs de DNMTs entraînent des déficits mnésiques dans des tâches d'apprentissage associatif (voir Contexte Scientifique Chapitre II : C.7) (Miller et Sweatt, 2007; Miller *et al.*, 2008, 2010; Day *et al.*, 2013). Cependant, dans nos conditions expérimentales, la discrimination entre l'orifice dit actif et l'orifice inactif reste inaltérée tout au long de l'expérience (voir Résultats expérimentaux Chapitre I : A - Augmentation de la consommation de cocaïne), indiquant que le traitement par les inhibiteurs de DNMTs n'altère pas le conditionnement opérant des animaux.

Les inhibiteurs de DNMTs possèdent des effets antidépresseurs, qu'ils soient injectés dans des structures cérébrales ciblées (NAc, hippocampe, cortex orbital ventrolatéral) ou de manière

systémique (LaPlant *et al.*, 2010; Sales *et al.*, 2011; Xing *et al.*, 2014). Pourtant, l'administration d'antidépresseurs, comme la fluoxétine, ou de manière moins conventionnelle, le baclofen (Aley et Kulkarni, 1990; Car et Wiśniewska, 2006), diminue l'AA de cocaïne (Glatz *et al.*, 2002; Oleson *et al.*, 2011). De plus, la venlafaxine, un antidépresseur agissant sur les systèmes sérotoninergique et noradrénergique, réduit les effets subjectifs de la cocaïne chez des sujets humains (Foltin *et al.*, 2003). L'ensemble de ces données nous permet d'écarter la possibilité que les effets antidépresseurs de nos inhibiteurs soient la cause de l'accroissement des propriétés renforçantes de la cocaïne.

Enfin et surtout, on peut postuler qu'une augmentation de l'activité locomotrice due au traitement par les inhibiteurs de DNMTs serait à l'origine de l'augmentation du nombre de NPs et donc de la consommation de cocaïne des animaux. Cependant, des expériences préliminaires, dont les données ne sont pas exposées dans ces travaux, ainsi que la littérature (Anier *et al.*, 2010; Sales *et al.*, 2011), montrent que l'injection ICV ou systémique d'inhibiteurs de DNMTs ne modifie pas l'activité locomotrice des animaux.

C - Perspectives

Dans le but de définir si l'augmentation des propriétés renforçantes de la cocaïne due au traitement par la 5-dAZA est imputable à telle ou telle structure du système de récompense, les expériences sous le protocole de FR pourraient être reconduites en ciblant l'injection des inhibiteurs de DNMTs directement soit dans le CPFm, soit dans le striatum dorsal (CPu) ou ventral (NAc).

On peut envisager également de tester l'effet d'un donneur de groupement méthyle (méthionine ou S-adénosyl-L-méthionine) pour voir s'ils sont capables de réduire les propriétés renforçantes de la cocaïne. La suppression de la préférence de place à la cocaïne par l'injection de méthionine dans le CPF a déjà été démontrée chez la souris (Tian *et al.*, 2012).

Chapitre II : Analyse du méthylome

A - Sur l'ensemble du génome

Des régulations globales de la méthylation de l'ADN ont été démontrées dans différentes dépendances pharmacologiques. Ainsi, l'ADN est globalement hypométhylé dans le cortex frontal de sujets alcoolo-dépendants (Ponomarev *et al.*, 2012), et 20 % des promoteurs sont différentiellement méthylés (Manzardo *et al.*, 2012). En ce qui concerne les psychostimulants, le niveau global de méthylation de l'ADN varie dans le NAc et le CPFm suite à la prise chronique de nicotine ou d'amphétamine suivie d'une période de sevrage (Mychasiuk *et al.*, 2013). Concernant la cocaïne, bien que le niveau de méthylation globale ne soit pas modifié dans l'ensemble du cerveau (Fragou *et al.*, 2013), il diminue de manière significative dans le CPF (Tian *et al.*, 2012). Cependant, cette quantification de la méthylation dans le CPF ayant été réalisée sans séquençage, elle ne permet pas de déterminer quels gènes sont différentiellement méthylés.

Nous avons choisi de réaliser l'analyse du méthylome dans le CPFm car cette structure clé du système de récompense est une cible des projections dopaminergiques et, par conséquent, est largement impliquée dans les effets renforçants des drogues (voir Contexte Scientifique Chapitre I : C.3.3). De plus, en participant activement à la prise de décision, l'initiation et l'inhibition de l'action, le CPFm est une structure idéale pour étudier la prise volontaire de drogue, telle que le modèle d'AA de cocaïne. Les études antérieures par microarrays de l'équipe ont aussi été réalisées dans cette structure.

Nous sommes pionniers en la matière, en montrant que le pattern global de la méthylation de l'ADN du CPFm de rats est modifié par un traitement pharmacologique comme la cocaïne et/ou la 5-dAZA. Les analyses publiées de méthylome, réalisées dans le cerveau adulte, sont majoritairement centrées sur les îlots CpG (CGIs) et aucune ne fait état d'un quelconque traitement neuropharmacologique. Par conséquent, nous avons très peu d'éléments de comparaison concernant ces travaux.

De manière générale, notons tout d'abord que l'analyse du méthylome indique que seuls 9 % des modifications de la méthylation ont lieu dans des régions promotrices et 1,15 % seulement dans les CGIs, alors que la majorité des régulations de la méthylation étudiées à ce jour concerne des CGIs dans les promoteurs de gènes régulés par méthylation, tels que certains gènes suppresseurs de tumeurs. Ainsi, près de 96 % des régions différentiellement méthylées (DMRs) dans les promoteurs

ont un contenu en GC moyen ou faible, indiquant une corrélation inverse entre densité de GC et régulation de la méthylation (voir également Chapitre II : A.3 Gènes différentiellement méthylés). Cette corrélation inverse au niveau des promoteurs a permis de les classer en deux catégories, soit riches en GC (voire contenant un CGI) et hypométhylés, soit pauvres en GC et enrichis en 5-mC (Saxonov *et al.*, 2006; Weber *et al.*, 2007; Vinson et Chatterjee, 2012).

Les CGIs couvrent 1,15 % des variations de méthylation dans nos conditions expérimentales. Sachant qu'ils représentent environ 1 % du génome (Vinson et Chatterjee, 2012), il n'y a donc pas d'altération globale de la méthylation de l'ADN dans ces îlots. Certaines DMRs peuvent recouvrir plusieurs CGIs. Le nombre exact de CGIs différentiellement méthylés correspondant aux 1,15 % des DMRs est de 2240, soit 14,6 % des 15 302 CGIs recensés chez le rat (Sati *et al.*, 2012). On retrouve les mêmes proportions chez l'homme, puisque 16 % des CGIs sont méthylés dans le cerveau (Maunakea *et al.*, 2010). Parmi ces 14,6 % de CGIs dont la méthylation est régulée par la cocaïne et/ou la 5-dAZA, la proportion est : 30,5 % de CGIs dans les promoteurs, 52,4 % dans les régions intragéniques et 17,1 % dans les régions intergéniques. La proportion des CGIs (méthylés ou non) chez l'homme et la souris est approximativement de 50 % dans les promoteurs, 25 % dans les régions intragéniques et 25 % dans les régions intergéniques [voir Contexte Scientifique Figure 7 page 44 ; (Illingworth *et al.*, 2010)]. Si cette proportion est respectée dans le génome de rat, alors près de 9 % de tous les CGIs dans les régions promotrices sont différentiellement méthylés, environ 31 % de tous les CGIs intragéniques et 10 % de tous les CGIs intergéniques également. Les CGIs intragéniques sont ainsi trois fois plus enclins à être différentiellement méthylés que les autres. Une fois encore, ce profil de méthylation des CGIs ressemble à celui du cerveau humain puisque 3 % seulement des CGIs situés dans le promoteur sont méthylés, alors que c'est le cas de 34 % des îlots à l'intérieur des gènes (Maunakea *et al.*, 2010).

Finalement, notons que près de la moitié des régulations différentielles de la méthylation se situe dans des régions intragéniques, soulignant l'importance que revêt la méthylation de l'ADN au sein du gène, que celle-ci serve à réprimer des promoteurs alternatifs et/ou un bruit de fond transcriptionnel, ou encore à affiner la reconnaissance des séquences codantes afin de permettre que des mécanismes post-transcriptionnels se mettent en place (voir Contexte Scientifique Chapitre II : C.3.3). Il faut cependant nuancer cette observation par le fait que 4/5 des gènes différentiellement méthylés par la cocaïne et/ou la 5-dAZA possèdent une DMR dans le promoteur. Il est donc difficile de conclure quant à la prépondérance de la méthylation de la région promotrice par rapport à la méthylation intragénique sur la transcription du gène.

B - Effets de la cocaïne

Globalement, la cocaïne induit une hypométhylation de l'ADN dans le CPFm, ce qui est en accord avec l'hypométhylation observée dans l'ensemble du cortex préfrontal de souris injectées par la cocaïne (Tian *et al.*, 2012). On retrouve cette hypométhylation au niveau des gènes et de leurs promoteurs. Elle est particulièrement marquée si l'on considère les CGIs, qui sont surtout hypométhylés dans les régions intragéniques. Puisque la méthylation des CGIs est classiquement associée à la répression de la transcription, on peut s'attendre à ce que la cocaïne active les promoteurs alternatifs et/ou les séquences régulatrices distales présents au sein des gènes (Illingworth *et al.*, 2010; Maunakea *et al.*, 2010; Deaton et Bird, 2011). Elle activerait ainsi la transcription, soit du gène hôte ou d'autres gènes, soit de transcrits interférant avec l'expression du gène hôte ou d'autres gènes.

C - Effets de la 5-dAZA

D'après l'analyse du méthylome, la 5-dAZA agit surtout (~55 %) sur les régions géniques. Cependant, il a été proposé que la 5-dAZA déméthylait préférentiellement les séquences répétées intergéniques plutôt que les régions géniques (Lim *et al.*, 2010). De plus, chez le rat, 53 % de la méthylation totale du génome est située sur ces séquences répétées (Sati *et al.*, 2012). Nos résultats s'expliquent aisément si l'on considère la normalisation réalisée après le séquençage, qui supprime les séquences s'appariant plus d'une fois sur l'ensemble du génome. Environ 31 % des séquences ont ainsi été évincées de l'analyse du méthylome. Puisque que la normalisation ne prend pas en compte les séquences répétées de taille inférieure à 50 nucléotides, la proportion de DMRs comprenant des séquences répétées à travers le génome doit être supérieure à 31 %, une valeur à rapprocher des 53 % de la méthylation totale retrouvés chez le rat.

À l'instar de la cocaïne, la 5-dAZA agit préférentiellement dans les régions intragéniques et l'observation est frappante, une fois encore, lorsque l'on considère les CGIs. Ce résultat, associé au fait que les effets de la cocaïne et de la 5-dAZA ne sont pas indépendants, suggère que les régions intragéniques sont des cibles préférentielles des DNMTs. Pourtant, en l'absence de cocaïne, la 5-dAZA est censée démétyler préférentiellement les CGIs dans les régions promotrices (Wong *et al.*, 2013). Il est possible que les deux traitements interagissent pour cibler la position des DMRs. Une telle interaction entre la cocaïne et la 5-dAZA a été observée en ce qui concerne le sens de régulation de la méthylation, même si elle est difficile à interpréter.

D - Mode d'action de la 5-dAZA

D.1 Dans les neurones

La 5-dAZA est un analogue de la cytidine qui inhibe les DNMTs. Bien que son mécanisme d'action soit controversé dans les neurones post-mitotiques (voir Contexte Scientifique Chapitre II : C.5), plusieurs études montrent que l'injection d'inhibiteurs nucléosidiques de DNMTs dans le cerveau mature déméthyle les dinucléotides CpG (Levenson *et al.*, 2006; Miller et Sweatt, 2007; Anier *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2010). Nous montrons ici que les inhibiteurs de DNMTs ont un effet comportemental (augmentation des propriétés renforçantes de la cocaïne) mais également des effets globaux sur la méthylation du génome et l'expression des gènes. On peut citer le gène codant la reeline, connu pour être régulé par méthylation (voir Contexte Scientifique Chapitre II : C.9), pour lequel on trouve 260 régions dont la méthylation est régulée en réponse à la cocaïne et/ou la 5-dAZA. L'injection de 5-dAZA augmente l'expression de *Reln* dans le striatum, ce qui suggère que la déméthylation de ce gène induit une augmentation de son expression, en accord avec les données de la littérature (Kundakovic *et al.*, 2007; Miller et Sweatt, 2007). Ainsi, la 5-dAZA, en inhibant les enzymes responsables de la méthylation de l'ADN dans le cerveau mature par un mécanisme encore indéterminé, régule l'expression des gènes et induit des effets majeurs dans le comportement complexe de la prise de drogue.

Certains chercheurs pensent que la voie de déméthylation sous le contrôle de la famille TET pourrait participer à l'effet déméthylant de la 5-dAZA. En effet, contrairement à la 5-mC, la 5-hmC est enrichie dans les régions promotrices riches en GC et au niveau du site d'initiation de la transcription, de même que la protéine TET1 (Williams *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2011). Par conséquent, une réduction générale de l'activité catalytique des DNMTs pourrait avoir un effet déméthylant puissant sur des régions peu méthylées comme les régions promotrices riches en GC.

D.2 La 5-dAZA, un agent déméthylant ?

La 5-dAZA est classiquement considérée comme un agent déméthylant dû au fait qu'elle entraîne la réexpression de gènes suppresseurs de tumeurs dont les promoteurs riches en GC sont hyperméthylés dans un certain nombre de cancers. Cependant, cette appellation d'agent déméthylant est controversée, certains auteurs assurant que la 5-dAZA ne peut déméthyler seule l'ADN, encore moins dans des cellules ne se divisant pas (Patra et Bettuzzi, 2009). Nous avons retrouvé dans notre analyse globale du méthylome 1,5 fois plus de DMRs hyperméthylées que de DMRs hypométhylées

par la 5-dAZA, ce qui remet également en question l'action de cet inhibiteur de DNMTs en tant qu'agent déméthylant.

Il faut noter que la normalisation consistant à aligner l'étude sur le nombre de séquences présentes dans le plus petit échantillon s'est faite par rapport à la condition AA cocaïne + 5-dAZA. En effet, ce groupe expérimental comptait le plus petit nombre de fragments séquencés (77,5 % de fragments séquencés par rapport à la condition AA NaCl + véhicule et 73,7 % par rapport à la condition AA cocaïne + véhicule). On peut s'interroger sur la possibilité que cette différence indique un moindre enrichissement en 5-mC, car la 5-dAZA aurait provoqué une déméthylation plus importante.

La sonication de l'ADN inhérente à la technique n'est en réalité pas un processus aléatoire mais dépend de la séquence nucléotidique, du contenu en GC et probablement de la méthylation. En fait, les coupures occasionnées par les ultrasons interviennent préférentiellement dans les dinucléotides CpG (Grokhovskii, 2006; Grokhovsky *et al.*, 2011; Poptsova *et al.*, 2014). Sachant que la méthylation de l'ADN influe directement sur sa topologie (Diekmann, 1987; Zacharias *et al.*, 1988, 1990), et de ce fait, facilite sa sensibilité aux endonucléases (Lazarovici *et al.*, 2013), on peut postuler que l'action de la 5-dAZA ait pu influencer le processus de sonication, en diminuant le nombre de sites de coupures, créant ainsi une plus faible diversité de fragments d'ADN soniqués. D'autre part, des biais ont été mis en évidence lors des étapes précédant le séquençage « nouvelle génération », la région génomique et le contenu en GC de la séquence d'ADN influençant non seulement la sonication mais aussi l'amplification par PCR lors de la création des bibliothèques (Teytelman *et al.*, 2009; Aird *et al.*, 2011; Veal *et al.*, 2012). L'effet hyperméthylant de la 5-dAZA est particulièrement marqué dans les CGIs, c'est-à-dire dans les séquences très riches en GC. Ces séquences ayant tendance à être enrichies lors de la préparation de bibliothèques pré-séquençage (Dohm *et al.*, 2008; Kozarewa *et al.*, 2009), il est dès lors possible que l'hyperméthylation induite par la 5-dAZA soit surestimée. L'impact de la 5-dAZA sur les étapes de sonication et d'amplification par PCR expliquerait la différence dans le nombre de fragments d'ADN séquencés par rapport aux autres conditions expérimentales. Si tel était le cas, il faudrait assumer une perte d'informations car une partie du génome différenciellement méthylé par la 5-dAZA n'aurait pas été incluse dans l'analyse du méthylome. Cela expliquerait partiellement l'effet majoritairement hyperméthylant de ce composé.

Enfin, il faut souligner le fait que les mécanismes épigénétiques qui régulent la conformation de la chromatine n'étant pas indépendants (voir Contexte Scientifique Chapitre II : C.9), cette

hyperméthylation de l'ADN pourrait aussi être un effet indirect d'une déméthylation induite par la 5-dAZA, suite par exemple à des modifications post-transcriptionnelles des histones ou d'autres processus agissant de concert avec la méthylation de l'ADN.

E - Limites et perspectives

Bien qu'une dégradation de la DNMT1 induite par la 5-dAZA en absence de réplication de l'ADN a été démontrée *in vitro* (Ghoshal *et al.*, 2005), le problème du mode d'action de cet inhibiteur dans les neurones reste en suspens. Si la 5-dAZA doit s'incorporer dans l'ADN pour inhiber les DNMTs, il est possible que dans les neurones, ce processus fasse appel à une déméthylation suivie de l'action de systèmes de réparation de l'ADN qui inséreraient la 5-dAZA au lieu de la cytidine. L'inhibition de ces complexes protéiques d'excision de bases ou de nucléotides permettrait dans ce cas d'interférer avec l'inhibition des DNMTs et de déterminer le mécanisme d'action de cet inhibiteur nucléosidique dans les cellules post-mitotiques.

Que ce soit dans l'analyse du méthylome ou dans les validations ultérieures, le système utilisé pour enrichir l'ADN méthylé a été le « MethylCollector® Ultra, Active Motif ». Cette méthode utilise un complexe protéique MBD2b/MBD3L1 qui reconnaît spécifiquement les 5-mC et pas les cytosines non méthylées, ni les 5-hmC. Cette méthode alternative à l'immunoprécipitation d'ADN méthylé (MeDIP) a été choisie car elle permet de s'affranchir des problèmes de spécificité d'anticorps. Il faut noter néanmoins qu'en comparaison avec le MeDIP, elle enrichit préférentiellement les séquences riches en GC et ne reconnaît les 5-mC que dans le contexte d'un dinucléotide CpG (Nair *et al.*, 2011; De Meyer *et al.*, 2013). Cependant, dans les neurones, la majorité de la méthylation, et surtout des variations de méthylation intervient sur les dinucléotides CpG (Lister *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2014). Notons que le système MethylCollector® Ultra est plus sensible que le MeDIP (De Meyer *et al.*, 2013). Ce système d'analyse du méthylome, appelé « MBD Ultra-Sequencing » est aujourd'hui une des méthodes les plus fiables pour étudier les variations de méthylation sur des quantités réduites de tissus comme le CPFm (Li *et al.*, 2014).

Idéalement, l'analyse optimale consisterait à mesurer la transcription de tous les gènes sur les mêmes tissus. Cela pourrait se faire à l'aide, par exemple, soit d'un séquençage des ARNm présents dans les cellules (RNA-Seq), soit d'une immunoprécipitation de la chromatine dirigée contre l'ARN polymérase II suivie d'un séquençage (RNA Pol II ChIP-Seq), soit encore par une méthode appelée « Global Run-On Sequencing » mesurant l'expression des gènes dont la transcription est engagée.

Chapitre III : Gènes différentiellement méthylés

A - Cocaïne et méthylation de gènes

Notre équipe, ainsi que d'autres laboratoires, ont montré que certains gènes étaient différentiellement méthylés par la cocaïne dans le cerveau. Cette drogue régule la méthylation de gènes codant des protéines de la myéline (Nielsen *et al.*, 2012), des facteurs de transcription comme FosB (Anier *et al.*, 2010), ou encore des protéines impliquées dans la plasticité cérébrale comme CDKL5 (Carouge *et al.*, 2010) ou PP1C β (sous-unité catalytique β de la protéine phosphatase 1) (Pol Bodetto *et al.*, 2013). Notons que l'injection ICV de 5-dAZA déméthyle le gène PP1C β et annule la répression par la cocaïne de l'expression de ce gène (Pol Bodetto *et al.*, 2013).

Suite à l'analyse du méthylome, nous avons validé environ une dizaine de gènes différentiellement méthylés en réponse à l'AA de cocaïne et/ou au traitement par la 5-dAZA. La sélection de ces gènes est basée, en général, sur leur participation probable dans les mécanismes de plasticité. Les produits des gènes *Rock1*, *Pak3* ou encore *Arhgef6* et *Arhgef9*, régulent dynamiquement la réorganisation du cytosquelette d'actine dans les synapses par les Rho GTPases Rac, Cdc42 et RhoA [Figure 36 ; (Ba *et al.*, 2013)]. Les protéines collaborent ainsi de manière active à la transmission et à l'intégration des potentiels post-synaptiques, donc au transfert de l'information entre les neurones. Leur régulation par la cocaïne en fait des candidats sérieux pour comprendre la plasticité sous-jacente aux mécanismes neurobiologiques responsables de la dépendance.

Lors du choix des gènes et DMRs à valider, nous nous sommes aussi efforcés de varier la position de la DMR dans la région promotrice ou le corps du gène, afin de pouvoir corréler le sens de variation de la méthylation, la position de la DMR et les modifications de l'expression du gène. Bien sûr, ces résultats ne sont qu'indicatifs, car ils ne représentent qu'une faible proportion des gènes caractérisés dans l'analyse du méthylome. De manière surprenante, certains résultats remettent néanmoins en cause la vision conventionnelle selon lequel d'une part, la méthylation du promoteur entraînerait l'inhibition de la transcription du gène cible et, d'autre part, la méthylation intragénique serait corrélée à l'activation de la transcription. Une difficulté supplémentaire vient du fait que souvent un gène possède plusieurs DMRs dont la méthylation ne varie pas de concert selon les traitements pharmacologiques.

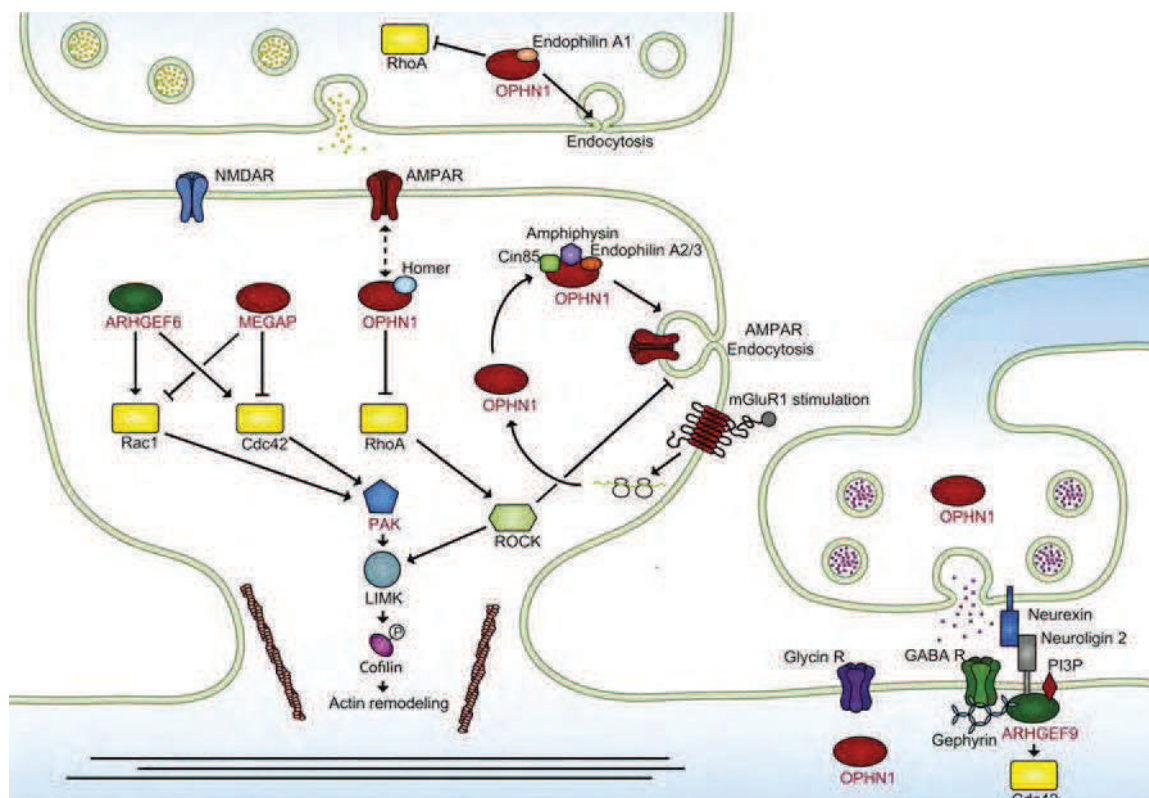


Figure 36 : Signalisation cellulaire liée à la dynamique du cytosquelette d'actine dans les synapses (Ba *et al.*, 2013)

La figure représente une synapse excitatrice sur la gauche et une synapse inhibitrice sur la droite. Les Rho GTPases sont représentées par les rectangles jaunes. Les protéines activatrices des petites protéines G, les GEFs (Guanine nucleotide exchange factor) sont représentées par les ovales verts et les protéines inhibitrices des Rho GTPases, les GAPs (GTPases activating protein), par les ovales rouges. ARHGEF6 et ARHGEF9 régulent les Rho GTPases. PAK3 et ROCK1 sont des effecteurs de ces petites protéines G.

B - Corrélation entre méthylation et expression

La vision classique de la méthylation implique une répression de l'expression du gène lorsque la région hyperméthylée est un promoteur riche en GC (voir Contexte Scientifique Chapitre II : C.3.1 b) Promoteurs de gènes). Pourtant, notre résultat concernant le CGI de *Arf6* vient contredire cette vue, puisque la déméthylation totale du promoteur par la 5-dAZA n'induit aucun accroissement de la transcription. Les résultats concernant *Cnrip1* sont également assez surprenants puisque l'expression de ce gène est induite par la cocaïne malgré une augmentation de la méthylation de la région promotrice. D'autres exemples abondent dans ce sens, en particulier quand les régions concernent des promoteurs dont le contenu en GC est moyen ou faible (Weber *et al.*, 2007). Ceci concerne près de 96 % des DMRs des régions promotrices dans notre étude, y compris

celle de *Cnrip1*. La méthylation de ce type de promoteur n'empêcherait pas l'expression du gène (Weber *et al.*, 2007), et aurait un rôle encore indéterminé (voir Contexte Scientifique Chapitre II : C.3.1 b) Promoteurs de gènes). La cocaïne, tout comme la 5-dAZA, augmente la transcription de *Cnrip1* par des mécanismes probablement indépendants de la méthylation de l'ADN. Notons que la cocaïne et la 5-dAZA ayant un effet significatif sur l'expression de *Cnrip1*, ce gène devient un candidat potentiel pour participer à la modification du comportement d'AA de cocaïne chez les rats traités par la 5-dAZA.

La méthylation au sein même des gènes a souvent été corrélée à l'activation de la transcription (voir Contexte Scientifique Chapitre II : C.3.2). Sur l'ensemble des gènes validés, nous n'avons pas pu établir de corrélation de ce type. Au contraire, les gènes *Hdac2* et *Arhgef9*, dont la DMR intragénique est déméthylée par la cocaïne, voient leur expression augmenter, indiquant que la méthylation au sein du corps des gènes est dans ce cas une marque répressive. Ceci est en accord avec une étude qui montre que dans le cerveau, la méthylation intragénique n'est pas corrélée à une activation de la transcription des gènes concernés, mais est synonyme de répression (Aran *et al.*, 2011). Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer la répression de ces gènes par une hyperméthylation intragénique, que ce soit par exemple la répression de promoteurs alternatifs (Maunakea *et al.*, 2010), ou encore celle de séquences régulatrices distales. Ces dernières étant situées dans les introns, cette hypothèse ne peut être retenue dans le cas de *Hdac2*, où la DMR régulée par la cocaïne recouvre l'exon 9. De même, il est établi que la 5-mC intragénique diminue l'activité transcriptionnelle de l'ARN polymérase II (Lorincz *et al.*, 2004; Veloso *et al.*, 2014). Une possibilité expliquant la répression de la transcription par méthylation intragénique réside dans la topologie de l'ADN. En effet, les 5-mC favorisent la forme Z de l'ADN, une double hélice gauche ne possédant qu'un sillon mineur (Zacharias *et al.*, 1990). Or cette forme d'ADN interfère avec la transcription des gènes, que ce soit par l'induction de changements locaux de conformation, le déplacement des nucléosomes ou encore en entravant la liaison des facteurs de transcription (Garner et Felsenfeld, 1987; Wang et Vasquez, 2007; Belotserkovskii *et al.*, 2013). D'autre part, la forme Z de l'ADN régule l'expression des gènes par le biais de mécanismes post-transcriptionnels, comme la liaison d'enzymes d'édition de l'ARN (Herbert *et al.*, 1997). Ainsi, la méthylation de l'ADN au sein de la séquence codante a des répercussions multiples sur la régulation de l'expression des gènes ainsi que sur les mécanismes post-transcriptionnels.

Bien que nous n'ayons pas eu l'opportunité de vérifier si les DMRs obtenues dans l'analyse du méthylome étaient impliquées dans l'épissage alternatif, une observation étonnante concerne le gène

Hdac2, qui ne possède qu'un seul variant d'épissage alternatif chez le rat contre 4 chez la souris et 18 chez l'homme. Or, une partie des DMRs issues de l'analyse du méthylome du rat coïncident avec les événements d'épissage alternatifs présents chez la souris et l'homme. Par exemple, chez la souris un événement de rétention d'intron correspond à la DMR 110815 autour de l'exon 12 et l'initiation de la transcription d'un transcrit non codant sur l'exon 6 est aligné avec la DMR 110817. La méthylation empêche-t-elle l'épissage alternatif ou cet épissage n'est-il pas encore caractérisé chez le rat ? Il faut noter que la méthylation de l'ADN est particulièrement marquée au niveau des jonctions introns-exons et de certains événements d'épissage alternatifs (Schwartz *et al.*, 2009; Chodavarapu *et al.*, 2010; Sati *et al.*, 2012), et que des protéines se liant aux 5-mC comme MeCP2 régulent cet épissage (Young *et al.*, 2005).

C - Méthylation et plasticité

La méthylation de l'ADN est un processus très dynamique dans le cerveau. Miller et Sweatt mettent en évidence des cycles de méthylation / déméthylation dans les 24h suivant un conditionnement pavlovien sur les gènes codant la protéine phosphatase 1 et la reeline (Miller et Sweatt, 2007). Levenson *et al.* évoquent une régulation de la méthylation de la reeline et du « brain-derived neurotrophic factor » (BDNF) suite à un traitement par des inhibiteurs de DNMTs après seulement une heure (Levenson *et al.*, 2006). De manière encore plus frappante, l'activité neuronale elle-même induit, *ex vivo*, une régulation dynamique rapide de la méthylation de gènes comme celui codant le BDNF (Martinowich *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2009). *In vivo*, elle modifie le pattern de méthylation de l'ensemble du génome (1,4 % des CpG du génome étant différentiellement méthylés suite à une stimulation électrique à haute fréquence) (Guo *et al.*, 2011a). Il convient donc de considérer la méthylation de l'ADN comme un phénomène en constante évolution, jouant probablement un rôle clé dans la plasticité des neurones.

Par ailleurs, on sait que la cocaïne, par l'intermédiaire de certains facteurs épigénétiques tels que la DNMT3a ou HDAC2, modifie fortement le nombre et la morphologie des épines dendritiques dans les structures du système de récompense (Robinson et Kolb, 1999, 2004; Robinson *et al.*, 2001; Guan *et al.*, 2009; LaPlant *et al.*, 2010). La surexpression de la DNMT3a provoque une augmentation du nombre d'épines dendritiques dans le NAc comparable à celle induite par la cocaïne ; cette dernière augmentation est d'ailleurs bloquée par des inhibiteurs de DNMTs (LaPlant *et al.*, 2010).

D - Méthylation et drogues

Vu le peu d'études disponibles concernant la méthylation de gènes en réponse aux drogues dans le cerveau, une étude comparative est difficile à établir. Pourtant, un certain nombre de gènes ont été identifiés comme étant régulés par méthylation dans un comportement de prise de drogue dans des études basées sur l'analyse de la méthylation des lymphocytes. Ainsi, une corrélation a été établie entre le comportement compulsif de consommation d'alcool chez des patients dépendants et la méthylation du gène de la pro-opiomélanocortine, impliquée dans l'axe corticotrope et la réponse au stress (Muschler *et al.*, 2010). On retrouve aussi une hyperméthylation de la région promotrice du gène *OPRM1* codant le récepteur mu aux opioïdes chez des individus alcoolo-dépendants (Zhang *et al.*, 2012) ainsi que chez des héroïnomanes (Yuferov *et al.*, 2010). Concernant la cocaïne, la méthylation du gène codant le récepteur à la neurokinine 3 est hypométhylé après un traitement chronique par la drogue (Barros *et al.*, 2013). Cependant, ces études ne concernent pas le statut des gènes dans le SNC.

E - Critiques et perspectives

Nos données ont permis de caractériser un grand nombre de gènes différentiellement méthylés en réponse à la cocaïne et/ou la 5-dAZA. L'expression d'un petit nombre de gènes a été mesurée en réponse à ces deux traitements. La question se pose alors de savoir lesquels sont impliqués dans l'augmentation des propriétés renforçantes de la cocaïne par la 5-dAZA. Pour cela, il faudra revenir au comportement d'AA de cocaïne en ciblant les gènes candidats par invalidation de leur expression, ou les protéines correspondantes à l'aide d'inhibiteurs enzymatiques ou d'antagonistes, selon leur nature.

Le second problème qui se pose concerne l'hétérogénéité du tissu cérébral. Les neurones représentant seulement 10 % de l'ensemble du cerveau, les différences que nous avons observées dans la méthylation ou l'expression des gènes ne sont pas restreintes aux neurones. Cependant, la méthylation de l'ADN est plus abondante (Li *et al.*, 2014) et plus variable (Iwamoto *et al.*, 2011) dans les neurones que dans les autres cellules et ces disparités sont particulièrement présentes au sein des gènes et des séquences régulatrices distales (Kozlenkov *et al.*, 2014).

Enfin, on peut s'interroger sur les mécanismes par lesquels la cocaïne et la 5-dAZA modifient la méthylation des gènes. Les intermédiaires majeurs sont très probablement les DNMT 1, 3a et 3b, dont on sait que l'expression est régulée de façon dynamique en réponse à la cocaïne autant dans le

CPF que dans l'ensemble du striatum (Anier *et al.*, 2010; LaPlant *et al.*, 2010; Pol Bodetto *et al.*, 2013). La question à propos du mécanisme par lequel la cocaïne, en inhibant des transporteurs des monoamines, régule ces enzymes se pose.

F - Conclusion générale

Les résultats présentés dans ce manuscrit mettent en évidence le rôle de la méthylation de l'ADN dans le mode d'action de la cocaïne dans un modèle de prise volontaire de drogue chez le rat, le test d'auto-administration intraveineuse de cocaïne. Nous avons d'abord démontré que l'inhibition des enzymes responsables de la méthylation de l'ADN augmentait les propriétés renforçantes de la cocaïne. Puis, dans l'espoir de cerner la nature des gènes incriminés, donc des mécanismes de plasticité responsables du changement de comportement, nous avons caractérisé des gènes différentiellement méthylés en réponse à la cocaïne et/ou au traitement par les inhibiteurs des ADN méthyltransférases. Cette analyse du méthylome a été validée en quantifiant la méthylation de certaines régions révélées comme méthylées par l'analyse globale. Nous avons également mesuré l'expression de quelques uns de ces gènes, sélectionnés par rapport à leur rôle dans la plasticité neuronale, en vue de la corrélérer avec les modifications de la méthylation. Alors que certains gènes, comme *Hdac2* ou *Arhgef9*, voient leur transcription inversement corrélée avec la méthylation d'une région, ce n'est cependant pas le cas général. En participant aux neuroadaptations induites par les drogues, les produits de ces gènes de plasticité sont autant de cibles en vue d'une approche pharmacologique de la dépendance aux drogues.

G - Publications et communications scientifiques

Liste des publications :

Pol Bodetto S, Carouge D, Fonteneau M, Dietrich J-B, Zwiller J, Anglard P (2013) Cocaine represses protein phosphatase-1C β through DNA methylation and Methyl-CpG Binding Protein-2 recruitment in adult rat brain. *Neuropharmacology* **73**:31–40.

Fonteneau M, Romieu P, Filliol D, Anglard P, Zwiller J (2014) DNMT inhibitors regulate cocaine self-administration by rats. Characterization of genes differentially methylated in the prefrontal cortex. *Article en préparation*

Communication scientifique :

Fonteneau M, Romieu P, Zwiller J. Inhibitors of DNA methyltransferases increase the reinforcing properties of cocaine in a self-administration test. *11ème Colloque de la Société des Neurosciences, Lyon, mai 2013, affiche.*



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



Sarah Pol Bodetto, Delphine Carouge¹, Mathieu Fonteneau, Jean-Bernard Dietrich, Jean Zwiller, Patrick Anglard*

Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives (LNCA), UMR 7364 CNRS, Université de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 5 August 2012
Received in revised form
28 April 2013
Accepted 7 May 2013

Keywords:
Cocaine
Drugs of abuse
DNA methylation
Epigenetics
Protein phosphatase-1
MeCP2
Rett syndrome

ABSTRACT

Repeated cocaine exposure induces epigenetic factors such as DNA methyl-binding proteins, indicating that resulting changes in gene expression are mediated by alterations in brain DNA methylation. While the activity of protein phosphatase type-1 (PP1) is involved in cocaine effects and in brain plasticity, the expression of the *PP1C β* catalytic subunit gene was identified here as modulated by cocaine. Its expression was induced together with that of *PP1C γ* in the brain of Methyl-CpG Binding Protein-2 (MeCP2) mutant mice, whereas *PP1C α* expression was not affected, illustrating a different regulation of PP1C isoforms. Repeated cocaine administration was found to increase DNA methylation at the *PP1C β* gene together with its binding to MeCP2 in rat caudate putamen, establishing a link between two genes involved in cocaine-related effects and in learning and memory processes. Cocaine also increased *DNMT3* expression, resulting in *PP1C β* repression that did not occur in the presence of DNMT inhibitor. Cocaine-induced *PP1C β* repression was observed in several brain structures, as evaluated by RT-qPCR, immunohistochemistry and Western blot, but did not occur after a single cocaine injection. Our data demonstrate that *PP1C β* is a direct MeCP2-target gene *in vivo*. They suggest that its repression may participate to behavioral adaptations triggered by the drug.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Acute and repeated cocaine exposures have been shown to induce changes in the expression of many genes in the brain (Robison and Nestler, 2011). Such transcriptional modifications can be rapid and transient, or persistent and account for long term behavioral changes following repeated exposure. Drug-induced behaviors have been attributed at least in part to epigenetic mechanisms that represent attractive candidates to explain long lasting behaviors, such as relapse after long periods of abstinence

(Colvis et al., 2005; Graff et al., 2011). However, while histone post-translational modifications by psychostimulants have been well documented, only recently it has been shown that cocaine also acts on DNA methylation involving DNA methyltransferases (DNMTs) and Methyl-CpG Binding Domain Proteins (MBDs) (Cassel et al., 2006; Carouge et al., 2010; Deng et al., 2010; Im et al., 2010; LaPlant et al., 2010; Host et al., 2011).

DNA methylation is usually considered as a stable covalent modification and involves the transfer of a methyl group to cytosines in CpG sites. Traditionally, DNA methylation in gene promoters is associated with transcriptional repression by preventing the binding of transcription factors to their cognate sites or by recruiting MBD proteins such as Methyl-CpG Binding Protein-2 (MeCP2). MeCP2 possesses repressive chromatin-remodeling activity (Deaton and Bird, 2011) and is considered as a negative or positive regulator of gene transcription (McGraw et al., 2011). Deviations from the normal DNA methylation pattern contribute to various diseases and have been observed in response to certain dietary components or drugs of abuse (Alegria-Torres et al., 2011; Graff et al., 2011). However, only a limited number of genes has been identified in adult brain as modulated by DNA methylation in response to drugs of abuse.

Abbreviations: CGI, CpG Island; CHIP, chromatin immunoprecipitation; CPP, conditioned place preference; CPU, caudate putamen; CREB, cAMP response element-binding protein; DARPP-32, dopamine- and cyclic AMP-regulated phosphoprotein-32; 5-dAZA, 5-Aza-2'-deoxycytidine; DNMT, DNA methyltransferase; 5-hmC, 5-hydroxymethylcytosine; 5-mC, 5-methylcytosine; MBD, Methyl-CpG Binding Proteins; MeCP2, Methyl-CpG Binding Protein-2; MeDIP, methylated DNA immunoprecipitation; NAC, nucleus accumbens; PFCx, prefrontal cortex; PKA, cAMP-dependent protein kinase; PP1C, protein phosphatase type-1 catalytic subunit; RT-qPCR, reverse transcription-quantitative PCR.

* Corresponding author. Tel.: +33 3 68 85 53 80; fax: +33 3 68 85 19 58.
E-mail addresses: anglard@unistra.fr, patrickanglard@inserm.fr (P. Anglard).
¹ Present address: Pacific Northwest Research Institute, Seattle, WA, USA.

0028-3908/\$ – see front matter © 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.05.005>

We have previously shown that cocaine and the antidepressant fluoxetine influence chromatin remodeling via Methyl-CpG Binding Proteins (MBD) and act through mechanisms involving DNA methylation (Cassel et al., 2006). Indeed, cocaine was found to induce the expression of *Mecp2* and MBD1 and we provided the first evidence for its effect on gene DNA methylation occurring in mature brain (Carouge et al., 2010). Thereafter, the striatal *Mecp2* knockdown was reported to block the development of escalating cocaine intake and to reverse the long-term trajectory of cocaine-taking behavior in rats with extended access to the drug (Im et al., 2010). Consistent with the latter findings, both conditioned place preference (CPP) and enhanced locomotion following repeated amphetamine administration were no longer observed in *Mecp2*^{308Y} mutant mice (Deng et al., 2010) lacking *Mecp2* domains essential for mediating chromatin folding and nucleosome compaction (Ghosh et al., 2010). Interestingly, overexpression of DNMT3A in the nucleus accumbens (NAc) reduced cocaine CPP and enhanced depression-like behavior, suggesting that DNMT3A mediates both cocaine- and stress-induced behavioral changes (LaPlant et al., 2010). In addition, injections of DNMT inhibitors in brain structures involved in learning and memory processes were shown to block acquisition or expression of cocaine-induced CPP (Han et al., 2010), further underlining the importance of DNA methylation in cocaine-related behavior.

By using microarrays, we have identified the β catalytic subunit of the protein phosphatase type-1 gene (*PP1C β*) as being repressed by chronic cocaine treatment. Three highly related catalytic subunit genes (*PP1C α* , *PP1C β/δ* and *PP1C γ*) have been reported, and alternative splicing generates the γ 1 and γ 2 isoforms (da Cruz e Silva et al., 1995). They associate with a host of divergent regulatory or targeting subunits controlling their differential cellular localization (Virshup and Shenolikar, 2009). In the brain, PP1C isoforms are present in dendritic spines or in the periphery of the soma (Allen et al., 1997; Nakanishi et al., 1997; Strack et al., 1999) and are also present in the nucleus (Moorhead et al., 2007). Their subcellular localization patterns allow independent roles for each isoform in regulating cellular processes, but their involvement in drug-induced behavior (Hiroi et al., 1999; Zachariou et al., 2002) or in learning and memory processes (Genoux et al., 2002; Graff et al., 2010) has been mainly studied by manipulating endogenous PP1 inhibitors that do not discriminate between PP1C isoforms. While cocaine inhibits PP1 activity through at least dopamine D1 receptors and dopamine- and cyclic AMP-regulated phosphoprotein (DARPP-32) phosphorylation (Svenningsson et al., 2004), very little is known about the mechanism by which the expression of each PP1C isoform is regulated.

In the present study, we investigated whether cocaine could modulate PP1 expression by a mechanism involving DNA methylation in brain structures related to the reward system. Since *Mecp2* expression critically regulates a wide range of psychostimulant effects (Feng and Nestler, 2010) and is required for proper learning and memory processes (Moretti et al., 2006; Pelka et al., 2006), the possible involvement of *Mecp2* in the regulation of PP1C isoforms was addressed. We showed that *PP1C β* expression is repressed following repeated cocaine treatment, as illustrated by RT-qPCR, Western blot and immunohistochemistry. The repression was associated with increased levels of DNMT and increased DNA methylation at the *PP1C β* gene together with its binding to *Mecp2*. Our data underline *PP1C β* gene as one of the rare genes identified so far in the brain as being regulated by DNA methylation in response to cocaine.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male Wistar rats (Janvier, France), 8–9 weeks old at their arrival in the laboratory, were housed in standard home cages in temperature- and humidity-controlled

rooms with a 12 h/12 h light/dark cycle (lights on at 7.00 am). Animals had access to food and water *ad libitum*. They were allowed to acclimate to laboratory conditions and were handled at least one week before experimental procedures. They were then intraperitoneally (i.p.) injected either once or repeatedly (1 injection per day) for 10 days with either 20 mg/kg cocaine hydrochloride (Cooper, Melun, France) or an equivalent volume of saline (0.9% NaCl). *Mecp2*^{308Y} and *Mecp2*^{2XV} males were from breeding pairs of *Mecp2*-308 mice backcrossed to C57BL/6J mice. Original mice were from Jackson Laboratories (B6-129S-*Mecp2*^{tm1Hzo}/J, stock number: 005439, USA). 13 weeks-old mice were killed by cervical dislocation and their brain was dissected. All procedures involving animal care were conducted in compliance with current laws and policies (Council directive 87848, 1987, Service Vétérinaire de la Santé et de la Protection animale, permission 67–165 to JZ).

2.2. Intracerebroventricular cannula implantation and 5-dAZA infusion

Rats were anesthetized by intraperitoneal injection (1 ml/kg) of a 5:1 (v/v) mixture containing 0.1 g/ml ketamine (Imalgene 1000, Merial) and 2% xylazine (Rompun, Bayer). 23-gauge stainless steel guide cannulae were implanted bilaterally using the stereotaxic coordinates: -0.9 mm AP, ± 1.8 mm ML and -3 mm DV from the skull surface (Paxinos, 2007). For intracerebroventricular infusion, the infusion cannula extended 1 mm beyond the tip of the guide cannula. Guide cannulae were secured to the skull with dental cement and steel screws. Experiments were performed 5–7 days after implantation. 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-dAZA) (Sigma-Aldrich) was dissolved at a concentration of 1 μ g/ μ l in a sterile saline solution containing 10% DMSO and was stored at -20 °C. 5-dAZA (5 μ g in 5 μ l) or vehicle was infused daily 20 min before cocaine administration over a 2-min period using a 10 μ l Hamilton microsyringe. Infusion cannulae remained in place for 1 min after infusion to allow drug diffusion.

2.3. Reverse transcription-quantitative PCR analysis

Animals were sacrificed 5 h, 10 h or 15 h after the last i.p. injection and brain structures of interest were dissected, as previously described (Carouge et al., 2010). RNA was extracted (Ludwig et al., 2000) from the rat medial prefrontal cortex (PPCX) and the caudate putamen (CPU) and first strand cDNA was generated from 0.5 μ g of total RNA using random primers and Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). RT-qPCR was performed as previously described (Carouge et al., 2010). Primers for rat and mouse genes were from Sigma-Aldrich Co. and are listed in Table 1. Primers were designed with Primer 3 software (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>) used under stringent conditions and amplicons were selected to span exon borders to exclude false positive detection of genomic contaminations. Results were normalized to 36B4 used as an internal control. Cycling conditions were: 95 °C for 14 min, then 40 cycles of 95 °C for 14 s, 60 °C for 18 s and 72 °C for 18 s. The specificity of each PCR product was verified by melting curve analysis and confirmed by 2% agarose gel electrophoresis. Real time PCR was conducted three times for each gene of interest, with samples in triplicates.

2.4. Methylated DNA immunoprecipitation assay

Animals were sacrificed 12 h after the last i.p. injection and the caudate putamen (CPU) was dissected, as previously described (Carouge et al., 2010). Methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP) was performed using Methylamp™ Methylated DNA Capture Kit (Epigentek Group, Brooklyn, NY). Genomic DNA was extracted from rat CPU and 0.5 μ g DNA aliquots were sheared by sonication in 150 μ l (Vibra™ Cell™ 75041, Bioblock Scientific) with 3 cycles of 12 s ON, 40 s OFF at 22% power. Sonicated fragments ranging from 200 bp to 1000 bp were divided into immunoprecipitated (IP) and input (Inp) portions. IP DNA was incubated with anti-5-methylcytosine antibody and the negative control was normal mouse IgG. The DNA fragments recovered were then used as templates for real time PCR using *PP1C β* PS2 R3 and FEX1S4 REX1R3 primer sets (Table 1), generating PCR fragments of 139 bp and 103 bp, respectively. Cycling conditions were: 95 °C for 15 min, then 60 cycles of 95 °C for 15 s, 58 °C for 20 s and 72 °C for 20 s. The specificity of the PCR product was verified by melting curve analysis and by 2% agarose gel electrophoresis. Real time PCR was conducted three times, with samples in duplicates. Relative enrichment of the target *PP1C β* sequence after MeDIP was estimated as the ratio of the signal in IP DNA divided by that in Inp DNA.

2.5. Chromatin immunoprecipitation assay

Animals were sacrificed 12 h after the last injection and the CPU was dissected, as previously described (Carouge et al., 2010). Cross-linking proteins to genomic DNA and ChIP assay have been essentially performed as previously described with an antibody raised against *Mecp2* (Carouge et al., 2010). Precipitated chromatin sonicated DNA fragments ranging from 0.3 to 1.2 kb were quantified by real time PCR using three different sets of primers for *PP1C β* (PS2 R3, FEX1S1 REX1R5 and FEX1S4 REX1R3; Table 1). Cycling conditions were: 95 °C for 15 min, then 50 cycles of 95 °C for 15 s, 58–62 °C (depending on the primers) for 20 s and 72 °C for 20 s. Single PCR products were verified both by assessing their melting temperature and by viewing them on agarose gel. Real time PCR was conducted three times. Immunoprecipitated

Table 1
Primer sequences for gene expression, ChIP and DNA methylation assays.

Gene	Primer sequence (5'–3')	Primer names	GenBank Acc. #
Gene expression			
<i>rmPP1Cα</i>	CCCAACTACTGTGGCGAGTT TTCTTATCAGCGGCTTGAG	FA2 RB2	r NM_031527 m NM_031868
<i>rmPP1Cβ</i>	TGGTGGATGATGAGTGGGA ACCTTTCTCGTGGATTAG	FA RB2	r BC062033.1 m NM_172707
<i>rPP1Cγ</i>	CCTGCCAAGTGAAGCA CTCTTTTATATCCGAGCTCC	FA2 RB2	r D90165.1
<i>mPP1Cγ</i>	GAGAGCCTAGAGTGGCTGAG CAAGACAATGAGGAAAGCAG	F R	m NM_013636
<i>rDNMT1</i>	AAATCCGCTCTGGAAGGTG GGGTAGAAAAGCAATGAG	FA RB	r NM_053354
<i>rDNMT3A</i>	GCTGAAGGAGAGGAACTGA TGCCGGAAGGTGAGTCTTG	FA RB	r NM_001003958
<i>rDNMT3B</i>	TCCGGTAAGAAGAACCTGT CTGATAGCCGCTCTCATCGT	F R	r NM_001003959
<i>r3684</i> (Rplp0)	GTGCTTCACTCCATCATCAA CCGACTCTTCTTTGCTTC	FA RB	r NM_022402
<i>m3684</i>	ACCTCTTCTTCCAGGCTTT CCACCTTGTCTCCAGTCTTT	FAS24 RA624	m NM_007475
ChIP/MeDIP			
<i>PP1Cβ</i>	TGAACGGGTACAGAAAGAG GATCAGAGAACTTCATCGC GGTGACTCGTAGGTGAGAA CGTCCGCATCTTTGAGC TAGGTGAGAAGCCGAGCTA GTCCGCATCTTGTAGGCA	FS2 R3 PEX1S1 REX1R5 PEX1S4 REX1R3	NW_047756

Primer sequences used for real time PCR are indicated together with gene names and GenBank/NCBI accession numbers. F and R indicate forward and reverse primers, respectively. Primer names and GenBank accession numbers relative to rat and mouse sequences are preceded by r or m, respectively. Primer names preceded by rm have been used for both rat and mouse gene expression.

DNA was calculated by first subtracting the amount of sequence present in the no antibody background control from the amount present in the immunoprecipitated DNA and then dividing by the amount of sequence in the diluted input material.

2.6. Immunohistochemistry

Four hours, 12 h or 20 h after the last i.p. injection, rats were sacrificed by an overdose of pentobarbital (100 mg/kg i.p.) and perfused transcardially with 100 ml saline followed by 1% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS, 250 ml). The brains were postfixed in 1% paraformaldehyde in PBS for 1 h before being kept overnight at 4 °C in 15% sucrose, then frozen in isopentane at –40 °C, and finally stored at –80 °C. Coronal tissue sections (16 μ m thick) were prepared using a Microm HM560 S_18 Cryostat. Immunohistochemistry was carried out as described previously (Cassel et al., 2006). Antibody incubation was performed overnight with a purified rabbit polyclonal antibody against PP1C β (Millipore) diluted 1:50 in horse serum. The PP1C β antibody was raised against the purified peptide (PRIANPPKKR, amino acids 318–327) corresponding to the C-terminus of PP1C β catalytic subunit (Strack et al., 1999). For each experimental condition, the number of PP1C β immunoreactive cells in the PFCx (anterior cingulate cortex), in the CPU and in the NAc (core and shell) was determined using the ImageJ processing software. The number of PP1C β immunoreactive cells was counted bilaterally on four consecutive sections per rat. Counting was made twice by an investigator blinded to the identity of the samples.

2.7. Western blot analysis of PP1C β in the caudate putamen

SDS-PAGE of CPU homogenate and immunoblotting were performed as previously described (Carouge et al., 2010). Antibody incubation was performed overnight with the anti-PP1C β antibody (Millipore) diluted 1:200 or with a goat anti- α -tubulin antibody (SantaCruz Biotechnol., Inc. CA) diluted 1:100 in blocking buffer. Blots were washed five times in 0.05% (v/v) Tween-20 in TBS and then incubated for 1 h at room temperature in secondary donkey anti-goat peroxidase-conjugated antibody or secondary donkey anti-rabbit peroxidase-conjugated antibody diluted 1:25,000 in blocking buffer. The detection was carried out using the chemiluminescence method (Pierce, Rockford, IL) with 1–10 min exposure to Kodak Biomax MR autoradiographic film (Eastman Kodak, Rochester, NY). Relative optical densities for PP1C β and α -tubulin proteins were quantified using ImageJ software (NIH, DC).

2.8. Statistical analysis

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

3. Results

3.1. Differential expression of PP1C isoforms in *Mecp2*^{308/Y} mice

In preliminary experiments, the expression of the three PP1C isoforms was evaluated in PC12 cells exposed to a DNMT inhibitor, the non-methylable cytosine analog 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-dAZA) that after incorporation into replicating DNA replaces methylated 5-mC resulting into DNA hypomethylation (Egger et al., 2004). A striking increase in *PP1C β* mRNA level was observed in response to this agent, whereas *PP1C α* level was not affected and *PP1C γ* level was not detected in these cells (data not shown). We next examined whether the expression of PP1C isoforms could be affected by *Mecp2* using *Mecp2*^{308/Y} mutant mice. The *Mecp2*^{308/Y} mice are male mice in which the *Mecp2* allele on chromosome X is truncated at amino-acid residue 308, similar to particular mutations found in Rett patients (Shahbazian et al., 2002). The resulting truncated protein lacks two C-terminal domains that are essential for mediating chromatin folding and nucleosome compaction (Ghosh et al., 2010). These mice share neurological deficits and cognitive impairments with *Mecp2* null mice (Moretti et al., 2005, 2006; McGill et al., 2006). Since symptoms onset in these mice only occur after 6–12 weeks of age (Shahbazian et al., 2002), we looked for *PP1C α* , *PP1C β* and *PP1C γ* expression in two dopaminergic projection areas of 13 weeks-old *Mecp2*^{308/Y} mice and their *Mecp2*^{X/Y} littermates. In the CPU of *Mecp2*^{308/Y} mice (Fig. 1A), the mRNA levels of *PP1C β* and *PP1C γ* were much higher than in their wild type counterparts, whereas no significant difference was observed between genotypes for the *PP1C α* transcript. The levels of *PP1C β* were also higher in the PFCx of *Mecp2*^{308/Y} mice (Fig. 1B), whereas the expression of *PP1C γ* was not detected and no difference was observed in the levels of *PP1C α* between genotypes. Overall, the transcription of PP1C isoforms resulting from the lack of *Mecp2* function shows that *PP1C β* and *PP1C γ* are regulated by DNA methylation, whereas *PP1C α* is not. The data

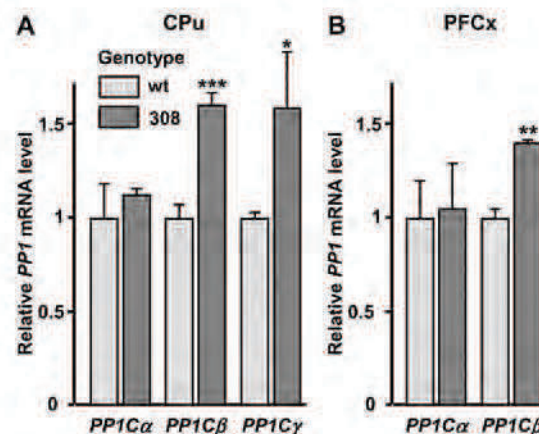


Fig. 1. Expression of *PP1C α* , *PP1C β* and *PP1C γ* in brain dopaminergic structures of wild type and *Mecp2*^{308/Y} mice. *PP1C α* , *PP1C β* and *PP1C γ* gene expression was evaluated by RT-qPCR in the CPU (A) and the PFCx (B) of 13 weeks-old wild type (wt) and *Mecp2*^{308/Y} mutant mice. Gene expression of PP1C isoforms was normalized to that of the 3684 gene. Data represent the mean \pm SD; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Student's *t*-test ($n = 3$ /group).

suggest that the overexpression of *PP1Cβ* and γ in mutant mice contribute to some cognitive deficits resulting from *Mecp2* dysfunction.

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

DNMTs have recently been reported to be modulated by cocaine in the NAc in which their expression has been involved in cocaine CPP, cocaine reward and dendritic spine formation (Anier et al., 2010; LaPlant et al., 2010). Since *PP1Cβ* expression was found to be constitutively induced in *Mecp2* mutant mice (Fig. 1) in which methylated genes are no longer repressed, we next investigated whether the expression of DNMTs was modulated by repeated cocaine treatment in the same brain structures. The time course of *DNMT1*, *DNMT3A* and *DNMT3B* mRNA was evaluated by RT-qPCR at 5, 10 and 15 h after the last injection (Fig. 2). *DNMT1* mRNA level remained unchanged in the CPu, whereas *DNMT3A* and *3B* mRNA levels were dynamically regulated after cocaine treatment. A 1.5-fold increase in *DNMT3A* mRNA level was observed 10 h after the last cocaine injection followed by a 50% decrease 15 h after the last cocaine injection. The time course of *DNMT3B* was quite different with a transient 1.5-fold increase observed 5 h after the last cocaine injection. In the PFCx, *DNMT1* mRNA level was not significantly affected by cocaine, whereas *DNMT3A* and *3B* mRNA levels were

increased 3-fold and 2.3-fold 15 h after the last cocaine injection, respectively. No significant changes in DNMT expression were observed following cocaine acute treatment (data not shown).

3.3. *PP1Cβ* promoter region is hypermethylated after chronic cocaine treatment

Since chronic cocaine treatment induced *DNMT3A* and *3B* expression, we next analyzed the DNA methylation status of the *PP1Cβ* gene. The *PP1Cβ* 5'-end sequence contains a CpG island (CGI) of 890 bp lying 369 bp upstream to 521 bp downstream to the transcription start site (Fig. 3A); part of this sequence including the transcription and the translation start sites was found to be homologous (>83%) to its human and mouse counterparts with conserved CpG positions (Suppl. Fig. S1). Methylation of the CGI containing sequence was evaluated by methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP) assay using DNA extracts from rat CPu. The *PP1Cβ* 5'-end was found to be methylated in the CPu of control rats, as illustrated by a specific PCR product that was not observed when the 5-methylcytosine antibody was replaced by IgG or in the absence of the antibody (Fig. 3B and C). Chronic cocaine treatment resulted in a 3.4-fold increase in *PP1Cβ* methylation 12 h after the last injection, as evaluated with the S2R3 primer set. Similar results were obtained using the Ex1S4R3 primer set (data not shown). The data are therefore consistent with the induction of DNMT expression by chronic cocaine treatment.

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

Since *PP1Cβ* methylation was increased by chronic cocaine treatment in the CPu (Fig. 3), *Mecp2* binding to *PP1Cβ* was next addressed in the same brain structure by ChIP assay. Chromatin was prepared from rat CPu and ChIP was performed with an antibody directed against *Mecp2*. DNA fragments recovered were analyzed

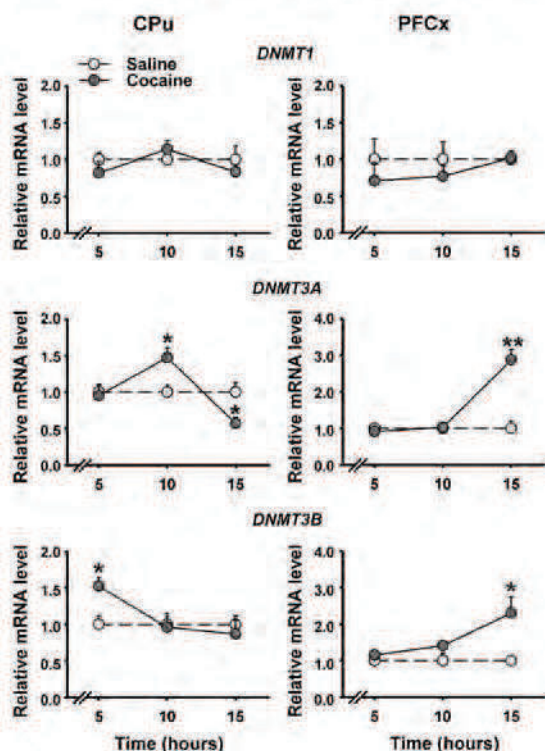


Fig. 2. DNMT expression in rat CPu and PFCx in response to chronic cocaine treatment. *DNMT1*, *DNMT3A* and *3B* mRNA levels were quantified by real time RT-PCR in the CPu and in the medial part of the PFCx of rats treated daily with saline or cocaine (20 mg/kg) for 10 days. The time course of DNMT expression was evaluated at the indicated time after the last cocaine injection. Data represent the mean \pm SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Student's *t*-test ($n = 3-4$ /group).

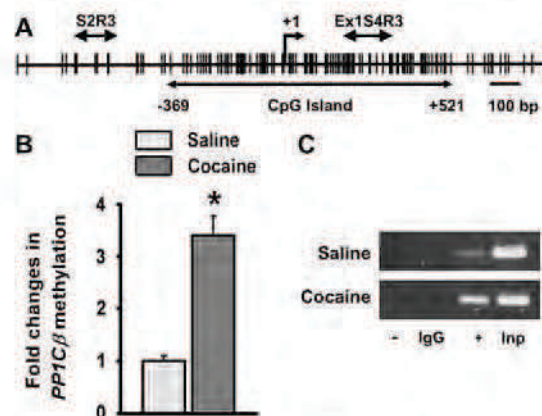


Fig. 3. DNA methylation status of the *PP1Cβ* 5'-flanking sequence. (A) The distribution of CpG dinucleotides, the position of the CpG island and that of the primers used to analyze DNA methylation are indicated relative to the transcription start site (+1). (B) Genomic DNA extracted from the CPu of rats treated with saline or cocaine (20 mg/kg) for 10 days was sheared by sonication and immunoprecipitated with anti-5-methylcytosine antibody. The enrichment of methylated DNA relative to input genomic DNA near the *PP1Cβ* gene transcription start site was quantified by qPCR. Data represent the mean \pm SEM (* $p < 0.05$, two-tailed *t*-test; $n = 4$ /group). (C) Representative PCR products are illustrated following IP performed with (-) or without (-) antibody or with control IgG or performed on input (Inp) genomic DNA.

by qPCR employing various *PP1C β* primer sets (Fig. 4A, Table 1). While *Mecp2* binding was not significantly affected by a single cocaine injection, a 50% increase was observed following the chronic treatment (Fig. 4B and C). No binding was observed in the absence of *Mecp2* antibody and IgG failed to immunoprecipitate *PP1C β* sequences (Fig. 4C). The increase in binding in response to repeated cocaine exposure is consistent with both cocaine-induced *PP1C β* gene methylation (Fig. 3) and cocaine-induced *Mecp2* levels (Cassel et al., 2006) in this brain structure.

3.5. *PP1C β* gene is repressed by chronic cocaine treatment in the CPU and the PFCx

Considering that *Mecp2* binding to the methylated *PP1C β* gene was increased by cocaine, the time course of *PP1C β* mRNA level was next evaluated by RT-qPCR in the CPU and the PFCx after chronic cocaine treatment. As shown in Fig. 5B, *PP1C β* mRNA level was reduced, the effect being maximal 15 h after the last cocaine injection. In the CPU and the PFCx, the reduction reached about 50%. In contrast, the expression of *PP1C α* was not affected by cocaine treatment, neither in the CPU, nor in the PFCx (Fig. 5A). The levels of *PP1C α* isoform in both brain structures therefore remain unaffected by either cocaine-induced *Mecp2* expression or by *Mecp2* dysfunction in *Mecp2^{308/Y}* mice (Fig. 1). Since i.c.v. infusions of DNMT inhibitors were previously shown to attenuate cocaine-induced downregulation of *PP1C γ* mRNA level and to delay cocaine-induced behavioral sensitization (Anier et al., 2010), we next tested whether *PP1C β* repression by cocaine was affected by 5-dAZA. In the CPU, the repression of *PP1C β* 15 h after the last cocaine injection was no longer observed when rats were simultaneously

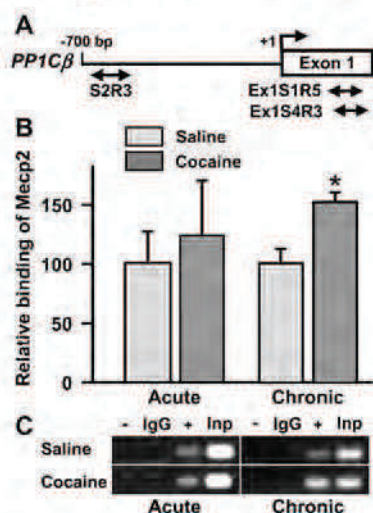


Fig. 4. *In vivo* binding of *Mecp2* to the *PP1C β* 5'-end. (A) Position of primers used to analyze chromatin immunoprecipitated fragments are indicated by arrows below the *PP1C β* 5'-flanking region. (B) Chromatin was isolated from the CPU of rats treated with saline or cocaine (20 mg/kg) for 1 (acute) or 10 (chronic) days, as indicated. The relative binding of *Mecp2* to *PP1C β* was evaluated 12 h after the last cocaine injection by real time PCR performed on DNA extracted from sonicated chromatin immunoprecipitated with anti-*Mecp2*. Two-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls post-hoc were performed. Each normalized value represents the average of 6 independent determinations \pm SEM (* p < 0.05, n = 3/group). (C) The increase in *Mecp2* binding to *PP1C β* in response to chronic cocaine treatment is illustrated by representative qPCR products loaded on agarose gels following ChIP assays performed with (+) or without (–) *Mecp2* antibody or with control IgG. PCR was also performed on an aliquot of total DNA isolated from chromatin prior to immunoprecipitation as an input control (Inp).

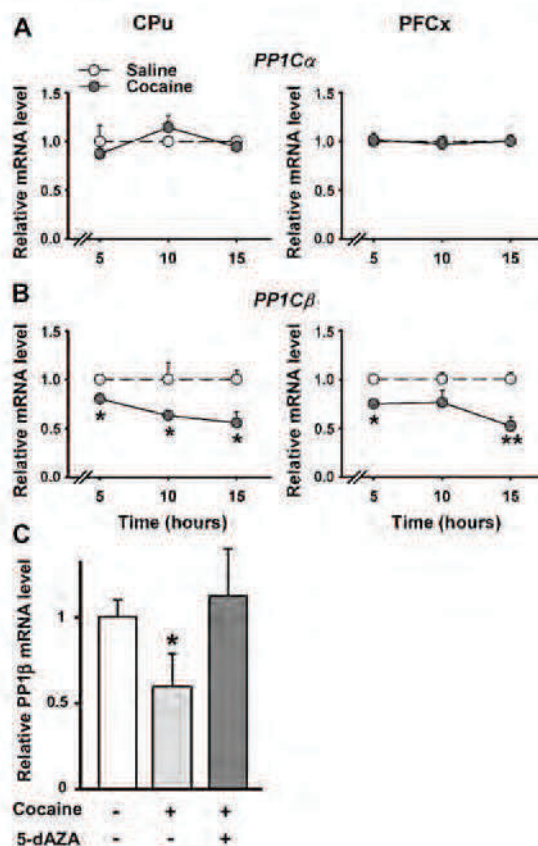


Fig. 5. Time course of *PP1C α* and β mRNA expression following chronic cocaine treatment. The effect of repeated cocaine administration on *PP1C α* (A) and β mRNA (B) levels at 5, 10 and 15 h after the last injection was evaluated by quantitative RT-PCR in the CPU and in the medial part of PFCx. (C) The repression of *PP1C β* 15 h after the last cocaine injection was no longer observed in rats simultaneously treated with 5-dAZA (5 μ g/day, i.c.v.). The amount of each transcript was normalized to that of 36B4 mRNA. Data represent the mean \pm SEM. * p < 0.05. ** p < 0.01. Student's *t*-test (n = 3–4/group).

treated with 5-dAZA by i.c.v. injection (Fig. 5C), thereby showing that DNMT activity is required for the repression of *PP1C β* by chronic cocaine treatment. The repression therefore most likely resulted from the binding of *Mecp2* to the methylated *PP1C β* gene 5'-end and is consistent with the role of *Mecp2* acting as a transcriptional repressor.

3.6. *PP1C β* protein is down-regulated by cocaine in the PFCx, the CPU and the NAC

We finally measured *PP1C β* protein expression in response to cocaine using immunohistochemistry and Western blot analysis. Chronic cocaine treatment was found to reduce the number of *PP1C β* immunopositive cells in the PFCx (Fig. 6A) and the CPU (Fig. 6B) 12 h after the last injection. The effect was similar in different structures examined (Fig. 6C), as we observed a 63% decrease in the anterior cingulate cortex (PFCx), a 55% decrease in the dorsolateral CPU, a 47% decrease in the NAC core and a 46% decrease in the NAC shell. No effect in *PP1C β* protein expression was observed 12 h after a single cocaine injection in the brain structures

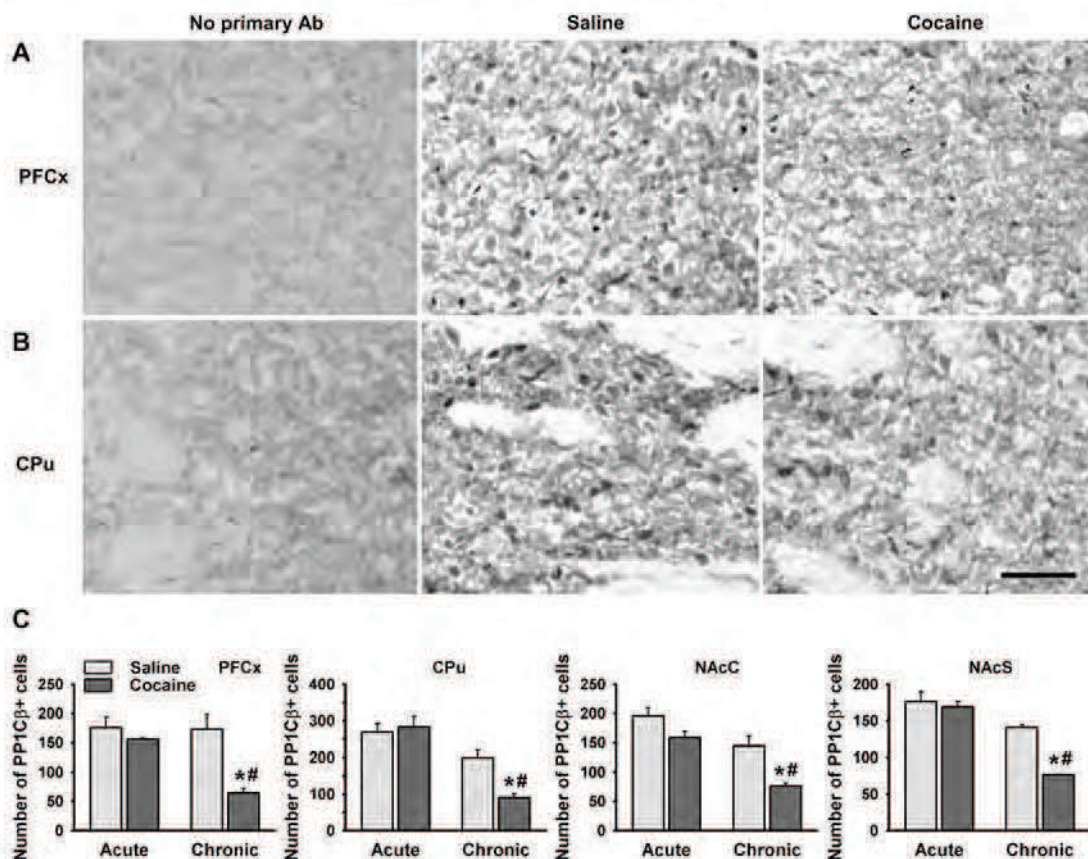


Fig. 6. Altered PP1C β protein expression in brain structures after cocaine treatment. Immunohistochemistry of PP1C β in PFCx (A) and CPu (B) of rats treated repeatedly (10 days, one i.p. injection per day) with saline or 20 mg/kg cocaine. Rats were sacrificed 12 h after the last injection and coronal brain sections were incubated with an antibody directed against PP1C β . Scale bar applicable to all micrographs, 50 μ m. No primary antibody refers to experiments in which the primary antibody was omitted in control rats. (C) Quantification of PP1C β immunoreactivity was performed in the PFCx, the CPu, the NAc core (NAcC) and the NAc shell (NAcS) of rats treated with saline or cocaine for 1 (acute) or 10 (chronic) days. Data represent the mean \pm SEM (*significantly different from the chronic NaCl group; #significantly different from the acute cocaine group, two-way ANOVA followed by Newman-Keuls post-hoc; $n = 4$ /group; PFCx: * $p < 0.01$, # $p < 0.01$; CPu: * $p < 0.01$, # $p < 0.005$; NAcC: * $p < 0.01$, # $p < 0.005$; NAcS: * $p < 0.005$, # $p < 0.001$).

examined (Fig. 6C). The time course of PP1C β protein expression was next evaluated in the dorsolateral CPu 4 h, 12 h and 20 h after acute and chronic cocaine treatment (Fig. 7A). Interestingly, while acute cocaine treatment did not affect the number of immunolabeled cells at any time, chronic cocaine treatment revealed a dynamic time-related regulation of PP1C β . Indeed, no repression was observed 4 h after the last injection indicating that the likely repression following 9 days of cocaine treatment is no longer observed 28 h later. In addition, the strong repression observed 12 h after the last injection, the repression was already much weaker 8 h later, PP1C β levels tending to get back to control levels 20 h after the last injection. PP1C β levels were further analyzed by Western blot in the CPu 12 h after acute or chronic cocaine treatment (Fig. 7B). The intensity of the band of 38k corresponding to PP1C β decreased 2.1 fold in response to chronic cocaine treatment, but was not affected by acute treatment. The repression is therefore consistent with the decrease in PP1C β immunolabeled cells only observed after repeated cocaine administration and further supports the transcriptional repression of PP1C β by chronic cocaine treatment.

4. Discussion

In the present study we first found that Mecp2 dysfunction leads to the overexpression of PP1C β and γ in brain structures of Mecp2 mutant mice, while PP1C α expression remains unaffected, highlighting a different regulation of PP1C isoforms by a mechanism involving DNA methylation. In contrast, PP1C β was repressed in rat brain structures in which Mecp2 expression is induced by cocaine, while no change was observed in PP1C α levels. The repression following repeated cocaine administration was associated with the upregulation of DNMT3A and 3B in the CPu and was not observed in rats treated with the DNMT inhibitor 5-dAZA. In addition, DNMT activation by cocaine resulted into DNA hypermethylation at the PP1C β promoter-associated CpG island and into increased Mecp2 binding to it.

DNA methylation is a covalent DNA modification recognized as a gene silencing signal that usually ensures the long-term shutdown of gene expression (Klose and Bird, 2003). Accordingly, DNA methylation in eukaryotes is a common feature of heterochromatin that is typically highly condensed and transcriptionally silent

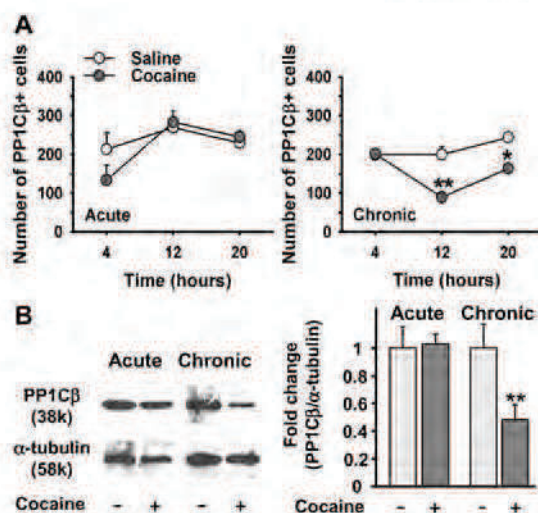


Fig. 7. Time course of PP1C β expression analyzed in the CPu following acute or chronic cocaine treatment. (A) Quantification of PP1C β immunoreactivity was performed in the CPu of rats sacrificed 4 h, 12 h or 20 h after the last cocaine injection as in Fig. 6. Data represent the mean \pm SEM (**significantly different from the chronic NaCl group 12 h, $p < 0.01$; *significantly different from the chronic NaCl group 20 h, $p < 0.05$; Student's *t*-test, $n = 4$ /group). (B) Western blot analysis of PP1C β in rat CPu 12 h after acute or chronic cocaine treatment. Identical amount of proteins from whole CPu extract were subjected to SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. The same blot was probed successfully with anti-PP1C β antibody and with anti- α -tubulin antibody as a loading control. Quantification of PP1C β expression is indicated on the right panel. Data represent the mean \pm SD, ** $p < 0.01$, Student's *t*-test, $n = 3$ /group.

(Tamaru, 2010). However, recent studies have shown that DNA methylation in the brain can be either stable or transient and followed by DNA demethylation (Miller and Sweatt, 2007; Anier et al., 2010). Indeed, the persistence of fear memory requires cortical DNA methylation to maintain remote memory, including a robust methylation of the memory suppressor gene protein phosphatase 2B (*PP2B/calcieneurin*), leading to its long lasting repression (Malleret et al., 2001; Miller et al., 2010). However, contextual fear conditioning was also shown to simultaneously repress *PP1C β* expression by DNA methylation and to induce that of *reelin* by DNA demethylation, but the methylation levels of both genes were found to return to baseline control levels within a day of training, although DNA methylation was required for memory formation and consolidation (Miller and Sweatt, 2007). In addition, alteration in DNA methylation in response to cocaine was found to repress *PP1C γ* and to simultaneously induce *fosB* expression in the NAc (Anier et al., 2010), further supporting the notion that methylation and demethylation can simultaneously occur in a given brain structure.

Interestingly, the levels of the genes modulated by fear conditioning appear to be similarly regulated by cocaine. In the NAc, repeated cocaine administration also represses *PP2B* expression (Hu et al., 2005), whereas we have shown that it induces that of *reelin* (Host et al., 2010). Likewise, the present study shows that the *PP1C β* gene is hypermethylated and transiently repressed by cocaine in the CPu. However, the repression was not observed after a single cocaine injection and requires repeated cocaine administration, thereby differing from what was observed in the hippocampus where it was already observed after one hour of contextual fear conditioning training (Miller and Sweatt, 2007). Although transient, the contribution of *PP1C β* repression in long-term effects of cocaine is likely.

More recently, DNA methylation and DNMTs have also been reported to be required in drugs of abuse-associated memories. In the hippocampus, DNMT inhibition leads to learning impairment in cocaine-induced CPP, whereas in the PFCx, the inhibition alters the retrieval of cocaine-induced CPP (Han et al., 2010). DNMT inhibition in the NAc also decreases cocaine-induced behavioral sensitization (Anier et al., 2010). The methylation of the *PP1C β* gene 5'-end we observe here was correlated with the induction of *DNMT3A* and *3B* expression that are required for *de novo* methylation, whereas no significant change was observed in *DNMT1* expression, that is essential for maintaining DNA methylation patterns (Goll and Bestor, 2005). A similar regulation of *DNMT3A* and/or *DNMT3B* expression has been recently reported following cocaine administration (Anier et al., 2010; LaPlant et al., 2010). The time course of their expression supports the notion of a biphasic regulation with a transient activation in response to each cocaine injection. Successive pulses of daily *DNMT* upregulation are likely to lead to progressive DNA methylation within 10 days of cocaine administration, and *PP1C β* repression may therefore occur after a critical number of methylation waves, thereby explaining why the repression is not observed after a single cocaine injection. Interestingly, a more prolonged passive or voluntary cocaine administration during 3–4 weeks was found to selectively induce *DNMT3A* expression in the NAc and this induction was still observed 4 weeks after the last cocaine exposure (LaPlant et al., 2010). One can speculate that such a sustained upregulation of *DNMT3A* might also occur in the CPu and the PFCx after prolonged cocaine exposure and result into a long lasting *PP1C β* repression.

Involvement of MBDs in memory- and drug-induced brain changes has been well documented. On one hand, the loss of MBD1 leads to autism-like behavioral deficits (Allan et al., 2008) and we previously showed that its expression is induced, together with that of *Mecp2*, by the antidepressant fluoxetine and by cocaine in adult rat brain (Suppl. Fig. S2) (Cassel et al., 2006). We extended these data by showing that *Mecp2* overexpression also occurs in brain structures of rats that daily self-administer cocaine (Host et al., 2011). Overexpression was also reported in the CPu and the hippocampus in a study that also demonstrated a striking role of *Mecp2* in compulsive-like drug response (Im et al., 2010). Indeed, the selective *Mecp2* knockdown in the dorsal striatum resulted in decreased cocaine intake and was attributed to homeostatic interactions between *Mecp2* and microRNA-212 controlling the BDNF levels. miR-212 expression was induced not only by 5-dAZA and by knocking down *Mecp2* in cell cultures, but also by knocking it down in the dorsal striatum of rats with cocaine access. Accordingly, overexpression of miR-212 in the CPu resulted in reduced *Mecp2* levels and in markedly lower cocaine intake in rats. As downstream *Mecp2*-target genes, *PP1C β* and γ may participate in cocaine effects in the CPu (Suppl. Fig. S2). Since we also reported a significant reduction of cocaine self-administration following HDAC inhibition (Romieu et al., 2008), the interaction between *Mecp2* and HDAC in transcriptional repression (Jones et al., 1998; Nan et al., 1998) may play a preponderant role in cocaine-induced behavior.

On the other hand, *Mecp2* mutations are known to cause Rett syndrome (Amir et al., 1999), a leading cause of mental retardation and autistic behavior in females, while *CDKL5* mutations are associated with its "early-onset seizure" variant (Weaving et al., 2004). We identified *CDKL5* as a *Mecp2*-target gene repressed by DNA methylation in response to cocaine (Carouge et al., 2010) and the role of *Mecp2* in its repression recently confirmed (Kilstrup-Nielsen et al., 2012) has shed new light into the mechanism by which mutations within two genes are leading to closely related syndromes with overlapping neurological symptoms. Various symptoms of Rett syndrome have been recapitulated in animal models, including deficits in spatial memory and

learning (Moretti et al., 2006; Pelka et al., 2006). The mutant *Mecp2*^{308/Y} mice exhibit enhanced *PP1Cβ* and *PP1Cγ* expression. Although the molecular events leading to synaptic dysfunction and deficits in learning and memory in these mice is still poorly understood, one may notice that histone H3 was found to be hyperacetylated in their cortex (Shahbazian et al., 2002). This modification being associated with transcriptional activation, its involvement in controlling *PP1Cβ* and *PP1Cγ* is likely. Accordingly, we found a decrease in acetylated histone H3 in response to cocaine and fluoxetine (Cassel et al., 2006). Since MBD-methylated CpG complexes recruit class I HDAC, the repression of *PP1Cβ* by cocaine may well result from HDAC recruitment and activation. In addition, the potential involvement of other histone modifications such as methylation cannot be excluded, based on their critical role in drug-induced behavior (Maze and Nestler, 2011). However, our data clearly demonstrate that *PP1Cβ* is a downstream target gene of *Mecp2*, since its repression by cocaine results from DNA methylation and increased *Mecp2* binding to its 5'-end (Suppl. Fig. S2).

The emerging role of ten–eleven translocation (TET) proteins and 5-hydroxymethyl-cytosines (5-hmC) in active DNA demethylation (Guo et al., 2011) deserves to be considered in relation to the expression of *PP1Cβ* in *Mecp2* mutant mice and in rats exposed to cocaine. TET1 converts 5-mC to 5-hmC that is an early intermediate in active DNA demethylation considered as reversing gene silencing (Flax and Soloway, 2011; Guo et al., 2011). The regulation of *PP1Cβ* expression by DNA methylation and by *Mecp2* may result from the relative abundance of 5-mC and 5-hmC present in its regulatory sequences. *Mecp2* binding affinity to 5-mC is recognized to be stronger than that to 5-hmC or to unmethylated cytosine in a CpG site (Valinluck et al., 2004; Hansen et al., 2010), although a similar affinity for both 5-mC and 5-hmC was recently reported, the latter being enriched in active genes (Mellen et al., 2012). On the other hand, global 5-hmC levels were found to be inversely correlated with *Mecp2* levels and the conversion of 5-mC to 5-hmC was blocked by *Mecp2* (Szulwach et al., 2011). This would imply that *Mecp2* induction by cocaine should block this conversion, therefore decreasing 5-hmC levels. Accordingly, it would be in line with the repression of *PP1Cβ* gene due to the increase in 5-mC levels at its 5'-end, although TET1 expression and activity was not affected by cocaine in the CPu (J. Zwiller, unpublished observation). Taken together, the data highlight an additional mechanism by which cocaine might control gene expression by modulating the balance between 5-mC and 5-hmC levels.

In contrast, based on studies described above (Szulwach et al., 2011), an increase in 5-hmC levels that may result from TET1 activity is likely to occur in *Mecp2* mutant mice, consistent with an increase in *PP1Cβ* and γ levels observed in these mice. Interestingly, amphetamine CPP and enhanced locomotion following repeated psychostimulant administration are not observed in *Mecp2*^{308/Y} mice, revealing impaired reward processing, impaired drug sensitization and learning deficits (Deng et al., 2010). While *Mecp2* expression appears to be required for the effect of psychostimulants (Im et al., 2010), various effects of cocaine also require a decrease in PP1 activity, as increased PP1 activity leads to a striking decrease in cocaine-induced CPP (Zachariou et al., 2002). It is likely therefore that repression of *PP1Cβ* by cocaine does not occur in the CPu or PFCx of these mice (Suppl. Fig. S2). In addition, both *PP1Cβ* and γ are overexpressed in *Mecp2*^{308/Y} mice indicating that *Mecp2* domains essential for chromatin folding and nucleosome compaction are required for its repressive function. Furthermore, when DNA methylation was inhibited by 5-dAZA in PC12 cells, it abolished the binding of *Mecp2* at the *PP1Cβ* gene resulting in its overexpression (data not shown), while in the brain, it prevented the cocaine-induced repression of both *PP1Cβ* (Fig. 5C) and *PP1Cγ*

(Anier et al., 2010). The repression therefore requires DNA methylation and the expression of a functional *Mecp2* protein (Suppl. Fig. S2).

Since PP1 is involved in learning and memory processes and in drug-induced behavior, the repression of *PP1Cβ* by cocaine raises the question of its functional significance in mediating cocaine responses. On one hand, recent studies on *Mecp2* and DNA methylation have underscored the importance of epigenetic mechanisms in establishing drug addiction (Feng and Nestler, 2010; Hopf and Bonci, 2010) and the identification of cocaine-target genes regulated by both remains a challenging issue. *PP1Cβ* and γ are part of them, but whether or how they contribute to cocaine addiction requires further investigation. On the other hand, DARPP-32 KO mice (Hiroi et al., 1999; Zachariou et al., 2002, 2006) exhibit higher PP1 activity and display decreased cocaine CPP, supporting the involvement of PP1 in cocaine behavioral effects. PP1 substrates include NR1 subunit of NMDA receptors (Snyder et al., 1998; Flores-Hernandez et al., 2002), GluR1 subunit of AMPA receptors (Yan et al., 1999), CaMKII and CREB (Genoux et al., 2002). PP1 downregulation by cocaine therefore increases the phosphorylation state of proteins playing key roles in synaptic plasticity, thereby potentiating the effects of the drug. Since enhanced CREB phosphorylation has been correlated with enhanced learning, repression of PP1 by cocaine may therefore participate in drug of abuse-associated memories. Indeed, the association between drugs of abuse and their environmental or experimental aspects has long been considered to be driven by associative learning (O'Brien et al., 1998) and addiction can be considered as a learning and memory disorder (Hyman, 2005). Unfortunately, the effect of cocaine on memory is complex, since it depends on the type of memory considered and the mode or the period of drug administration. For instance, repeated exposure to cocaine impairs spatial memory and causes transient deficits in attention (Muriach et al., 2010), whereas spatial memory was reported to be facilitated by post-training cocaine exposure (Iniguez et al., 2012). Repeated i.p. cocaine administration facilitates retention of recent memory formation in cocaine-sensitized animals (Perez et al., 2010), whereas working memory deficits have been reported in rats trained to self-administer cocaine (Nic Dhonnchadha and Kantak, 2011). Moreover, repeated consumption is known to induce 'habits', a form of procedural memory, which involves LTP at corticostriatal synapses depending on transcriptional mechanisms involving dopamine D1 receptors and CREB activation (Pittenger et al., 2006). *PP1Cβ* repression in the CPu may therefore contribute to the development and maintenance of 'habits' by potentiating CREB phosphorylation.

In conclusion, while there is a growing interest for the role of DNA methylation triggered by environmental factors, only a limited number of genes have been characterized in the brain as modulated by DNA methylation in response to drugs of abuse. Our data further support the concept that a pharmacological agent such as cocaine modulates the methylation pattern of genes in adult brain.

Conflict of interest statement

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

This work was supported by CNRS, by the Université de Strasbourg and by the Association Française du Syndrome de Rett (AFSR). S. Pol Bodetto and M. Fonteneau are recipients of a fellowship from the 'Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche'. We are grateful to Y. Humeau and B. Poulain for

generously providing Mecp2^{308/Y} mice and their Mecp2^{X/Y} littermates and to F. Gambino for genotyping the mice (Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, CNRS UPR 3212 et Université de Strasbourg, France).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.05.005>.

References

- Alegria-Torres, J.A., Baccarelli, A., Bollati, V., 2011. Epigenetics and lifestyle. *Epigenomics* 3, 267–277.
- Allan, A.M., Liang, X., Luo, Y., Pak, C., Li, X., Szulwach, K.E., Chen, D., Jin, P., Zhao, X., 2008. The loss of Methyl-CpG Binding Protein 1 leads to autism-like behavioral deficits. *Hum. Mol. Genet.* 17, 2047–2057.
- Allen, P.B., Ouimet, C.C., Greengard, P., 1997. Spinophilin, a novel protein phosphatase 1 binding protein localized to dendritic spines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 9956–9961.
- Amir, R.E., Van den Veyver, I.B., Wan, M., Tran, C.Q., Francke, U., Zoghbi, H.Y., 1999. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding Methyl-CpG-Binding Protein 2. *Nat. Genet.* 23, 185–188.
- Anier, K., Mahinovskaja, K., Aonurm-Helm, A., Zharkovskiy, A., Kalda, A., 2010. DNA methylation regulates cocaine-induced behavioral sensitization in mice. *Neuropsychopharmacology* 35, 2450–2461.
- Carouge, D., Host, L., Aunis, D., Zwiller, J., Anglard, P., 2010. CDK15 is a brain MeCP2 target gene regulated by DNA methylation. *Neurobiol. Dis.* 38, 414–424.
- Cassel, S., Carouge, D., Gensburger, C., Anglard, P., Burgun, C., Dietrich, J.B., Aunis, D., Zwiller, J., 2006. Fluoxetine and cocaine induce the epigenetic factors MeCP2 and MBD1 in adult rat brain. *Mol. Pharmacol.* 70, 487–492.
- Colvis, C.M., Pollock, J.D., Goodman, R.H., Impey, S., Dunn, J., Mandel, G., Champagne, F.A., Mayford, M., Korzus, E., Kumar, A., Renthal, W., Theobald, D.E., Nestler, E.J., 2005. Epigenetic mechanisms and gene networks in the nervous system. *J. Neurosci.* 25, 10379–10389.
- da Cruz e Silva, E.F., Fox, C.A., Ouimet, C.C., Gustafson, E., Watson, S.J., Greengard, P., 1995. Differential expression of protein phosphatase 1 isoforms in mammalian brain. *J. Neurosci.* 15, 3375–3389.
- Deaton, A.M., Bird, A., 2011. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.* 25, 1010–1022.
- Deng, J.V., Rodriguez, R.M., Hutchinson, A.N., Kim, I.H., Wetsel, W.C., West, A.E., 2010. MeCP2 in the nucleus accumbens contributes to neural and behavioral responses to psychostimulants. *Nat. Neurosci.* 13, 1128–1136.
- Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., Jones, P.A., 2004. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429, 457–463.
- Feng, J., Nestler, E.J., 2010. MeCP2 and drug addiction. *Nat. Neurosci.* 13, 1039–1041.
- Flax, J.D., Soloway, P.D., 2011. Methylation on the mind. *Nat. Neurosci.* 14, 1494–1496.
- Flores-Hernandez, J., Cepeda, C., Hernandez-Echeagaray, E., Calvert, C.R., Jokel, E.S., Fienberg, A.A., Greengard, P., Levine, M.S., 2002. Dopamine enhancement of NMDA currents in dissociated medium-sized striatal neurons: role of D1 receptors and DARPP-32. *J. Neurophysiol.* 88, 3010–3020.
- Genoux, D., Haditsch, U., Knobloch, M., Michalon, A., Storm, D., Mansuy, I.M., 2002. Protein phosphatase 1 is a molecular constraint on learning and memory. *Nature* 418, 970–975.
- Ghosh, R.P., Nikitina, T., Horowitz-Scherer, R.A., Gierasch, L.M., Uversky, V.N., Hite, K., Hansen, J.C., Woodcock, C.L., 2010. Unique physical properties and interactions of the domains of methylated DNA binding protein 2. *Biochemistry* 49, 4395–4410.
- Goll, M.G., Bestor, T.H., 2005. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 481–514.
- Graff, J., Kim, D., Dobbin, M.M., Tsai, L.H., 2011. Epigenetic regulation of gene expression in physiological and pathological brain processes. *Physiol. Rev.* 91, 603–649.
- Graff, J., Koshibu, K., Jouvenceau, A., Dutar, P., Mansuy, I.M., 2010. Protein phosphatase 1-dependent transcriptional programs for long-term memory and plasticity. *Learn. Mem.* 17, 355–363.
- Guo, J.J., Su, Y., Zhong, C., Ming, G.L., Song, H., 2011. Emerging roles of TET proteins and 5-hydroxymethylcytosines in active DNA demethylation and beyond. *Cell Cycle* 10, 2662–2668.
- Han, J., Li, Y., Wang, D., Wei, C., Yang, X., Sui, N., 2010. Effect of 5-aza-2-deoxycytidine microinjecting into hippocampus and prefrontal cortex on acquisition and retrieval of cocaine-induced place preference in C57BL/6 mice. *Eur. J. Pharmacol.* 642, 93–98.
- Hansen, J.C., Ghosh, R.P., Woodcock, C.L., 2010. Binding of the Rett syndrome protein, MeCP2, to methylated and unmethylated DNA and chromatin. *IUBMB Life* 62, 732–738.
- Hiroi, N., Fienberg, A.A., Halle, C.N., Alburges, M., Hanson, G.R., Greengard, P., Nestler, E.J., 1999. Neuronal and behavioural abnormalities in striatal function in DARPP-32-mutant mice. *Eur. J. Neurosci.* 11, 1114–1118.
- Hopf, F.W., Bonci, A., 2010. Dnmt3a: addiction's molecular forget-me-not? *Nat. Neurosci.* 13, 1041–1043.
- 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 Lis1 and reelin gene expression, as revealed by microarray technique. *J. Neurochem.* 113, 236–247.
- 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.
- Hu, X.T., Ford, K., White, F.J., 2005. Repeated cocaine administration decreases calcineurin (PP2B) but enhances DARPP-32 modulation of sodium currents in rat nucleus accumbens neurons. *Neuropsychopharmacology* 30, 916–926.
- Hyman, S.E., 2005. Addiction: a disease of learning and memory. *Am. J. Psychiatry* 162, 1414–1422.
- Im, H.I., Hollander, J.A., Bali, P., Kenny, P.J., 2010. MeCP2 controls BDNF expression and cocaine intake through homeostatic interactions with microRNA-212. *Nat. Neurosci.* 13, 1120–1127.
- Iniguez, S.D., Charntikov, S., Baella, S.A., Herbert, M.S., Bolanos-Guzman, C.A., Crawford, C.A., 2012. Post-training cocaine exposure facilitates spatial memory consolidation in C57BL/6 mice. *Hippocampus* 22, 802–813.
- Jones, P.L., Veenstra, G.J., Wade, P.A., Vermaak, D., Kass, S.U., Landsberger, N., Strouboulis, J., Wolffe, A.P., 1998. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat. Genet.* 19, 187–191.
- Kilstrup-Nielsen, C., Rusconi, L., La Montanara, P., Ciceri, D., Bergh, A., Bedogni, F., Landsberger, N., 2012. What we know and would like to know about CDK15 and its involvement in epileptic encephalopathy. *Neural Plast.* 2012, 728267.
- Klose, R., Bird, A., 2003. Molecular biology. MeCP2 repression goes nonglobal. *Science* 302, 793–795.
- LaPlant, Q., Vialou, V., Covington 3rd, H.E., Dumitriu, D., Feng, J., Warren, B.L., Maze, I., Dietz, D.M., Watts, E.L., Iniguez, S.D., Koo, J.W., Mouzon, E., Renthal, W., Hollis, F., Wang, H., Noonan, M.A., Ren, Y., Eisch, A.J., Bolanos, C.A., Kabbaj, M., Xiao, G., Neve, R.L., Hurd, Y.L., Oosting, R.S., Fan, G., Morrison, J.H., Nestler, E.J., 2010. Dnmt3a regulates emotional behavior and spine plasticity in the nucleus accumbens. *Nat. Neurosci.* 13, 1137–1143.
- Ludwig, M.G., Basset, P., Anglard, P., 2000. Multiple regulatory elements in the murine stromelysin-3 promoter. Evidence for direct control by CCAAT/enhancer-binding protein beta and thyroid and retinoid receptors. *J. Biol. Chem.* 275, 39981–39990.
- Malleret, G., Haditsch, U., Genoux, D., Jones, M.W., Bliss, T.V., Vanhoose, A.M., Weitlauf, C., Kandel, E.R., Winder, D.G., Mansuy, I.M., 2001. Inducible and reversible enhancement of learning, memory, and long-term potentiation by genetic inhibition of calcineurin. *Cell* 104, 675–686.
- Maze, L., Nestler, E.J., 2011. The epigenetic landscape of addiction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1216, 99–113.
- McGill, B.E., Bundle, S.F., Yayaoglu, M.B., Carson, J.P., Thaller, C., Zoghbi, H.Y., 2006. Enhanced anxiety and stress-induced corticosterone release are associated with increased Crh expression in a mouse model of Rett syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 18267–18272.
- McGraw, C.M., Samaco, R.C., Zoghbi, H.Y., 2011. Adult neural function requires MeCP2. *Science* 333, 186.
- Mellen, M., Ayata, P., Dewell, S., Kraicionis, S., Heintz, N., 2012. MeCP2 binds to 5hmC enriched within active genes and accessible chromatin in the nervous system. *Cell* 151, 1417–1430.
- Miller, C.A., Gavin, C.F., White, J.A., Parrish, R.R., Honasoge, A., Yancey, C.R., Rivera, I.M., Rubio, M.D., Rumbaugh, G., Sweatt, J.D., 2010. Cortical DNA methylation maintains remote memory. *Nat. Neurosci.* 13, 664–666.
- Miller, C.A., Sweatt, J.D., 2007. Covalent modification of DNA regulates memory formation. *Neuron* 53, 857–869.
- Moorhead, G.B., Trinkle-Mulcahy, L., Ulke-Lemee, A., 2007. Emerging roles of nuclear protein phosphatases. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8, 234–244.
- Moretti, P., Bouwknicht, J.A., Teague, R., Paylor, R., Zoghbi, H.Y., 2005. Abnormalities of social interactions and home-cage behavior in a mouse model of Rett syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 14, 205–220.
- Moretti, P., Levenson, J.M., Battaglia, F., Atkinson, R., Teague, R., Antalffy, B., Armstrong, D., Arancio, O., Sweatt, J.D., Zoghbi, H.Y., 2006. Learning and memory and synaptic plasticity are impaired in a mouse model of Rett syndrome. *J. Neurosci.* 26, 319–327.
- Muriach, M., Lopez-Pedrajas, R., Barcia, J.M., Sanchez-Villarejo, M.V., Almansa, I., Romero, F.J., 2010. Cocaine causes memory and learning impairments in rats: involvement of nuclear factor kappa B and oxidative stress, and prevention by topiramate. *J. Neurochem.* 114, 675–684.
- Nakanishi, H., Obaishi, H., Satoh, A., Wada, M., Mandai, K., Satoh, K., Nishioka, H., Matsuura, Y., Mizoguchi, A., Takai, Y., 1997. Neurabin: a novel neural tissue-specific actin filament-binding protein involved in neurite formation. *J. Cell. Biol.* 139, 951–961.
- Nan, X., Ng, H.H., Johnson, C.A., Laherty, C.D., Turner, B.M., Eisenman, R.N., Bird, A., 1998. Transcriptional repression by the Methyl-CpG-Binding Protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393, 386–389.
- Nic Dhonnchadha, B.A., Katak K.M., 2011. Cognitive enhancers for facilitating drug cue extinction: insights from animal models. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 99, 229–244.
- O'Brien, C.P., Childress, A.R., Ehrman, R., Robbins, S.J., 1998. Conditioning factors in drug abuse: can they explain compulsion? *J. Psychopharmacol.* 12, 15–22.
- Paxinos, G.W., Watson, C., 2007. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, sixth ed. Academic Press, Elsevier.

- Pelka, G.J., Watson, C.M., Radziewicz, T., Hayward, M., Lahooti, H., Christodoulou, J., Tam, P.P., 2006. Mecp2 deficiency is associated with learning and cognitive deficits and altered gene activity in the hippocampal region of mice. *Brain* 129, 887–898.
- Perez, M.F., Gabach, L.A., Almiron, R.S., Carlini, V.P., De Barioglio, S.R., Ramirez, O.A., 2010. Different chronic cocaine administration protocols induce changes on dentate gyrus plasticity and hippocampal dependent behavior. *Synapse* 64, 742–753.
- Pittenger, C., Fasano, S., Mazzocchi-Jones, D., Dunnett, S.B., Kandel, E.R., Brambilla, R., 2006. Impaired bidirectional synaptic plasticity and procedural memory formation in striatum-specific cAMP response element-binding protein-deficient mice. *J. Neurosci.* 26, 2808–2813.
- Robison, A.J., Nestler, E.J., 2011. Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. *Nat. Rev. Neurosci.* 12, 623–637.
- Romieu, P., Host, L., Gobaille, S., Sandner, G., Aunis, D., Zwiller, J., 2008. Histone deacetylase inhibitors decrease cocaine but not sucrose self-administration in rats. *J. Neurosci.* 28, 9342–9348.
- Shahbazian, M., Young, J., Yuva-Paylor, L., Spencer, C., Antalffy, B., Noebels, J., Armstrong, D., Paylor, R., Zoghbi, H., 2002. Mice with truncated MeCP2 recapitulate many Rett syndrome features and display hyperacetylation of histone H3. *Neuron* 35, 243–254.
- Snyder, G.L., Fienberg, A.A., Hagan, R.L., Greengard, P., 1998. A dopamine/D1 receptor/protein kinase A/dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein (Mr 32 kDa)/protein phosphatase-1 pathway regulates dephosphorylation of the NMDA receptor. *J. Neurosci.* 18, 10297–10303.
- Strack, S., Kni, S., Ebner, F.F., Wadzinski, B.E., Colbran, R.J., 1999. Differential cellular and subcellular localization of protein phosphatase 1 isoforms in brain. *J. Comp. Neurol.* 413, 373–384.
- Svenningsson, P., Nishi, A., Fisone, G., Girault, J.A., Nairn, A.C., Greengard, P., 2004. DARPP-32: an integrator of neurotransmission. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44, 269–296.
- Szulwach, K.E., Li, X., Li, Y., Song, C.X., Wu, H., Dai, Q., Irier, H., Upadhyay, A.K., Gearing, M., Levey, A.I., Vasanthakumar, A., Godley, L.A., Chang, Q., Cheng, X., He, C., Jin, P., 2011. 5-hmC-mediated epigenetic dynamics during postnatal neurodevelopment and aging. *Nat. Neurosci.* 14, 1607–1616.
- Tamaru, H., 2010. Confining euchromatin/heterochromatin territory: jumoni crosses the line. *Genes Dev.* 24, 1465–1478.
- Valinluck, V., Tsai, H.H., Rogstad, D.K., Burdzy, A., Bird, A., Sowers, L.C., 2004. Oxidative damage to Methyl-CpG sequences inhibits the binding of the Methyl-CpG Binding Domain (MBD) of Methyl-CpG Binding Protein 2 (MeCP2). *Nucleic Acids Res.* 32, 4100–4108.
- Virshup, D.M., Shenolikar, S., 2009. From promiscuity to precision: protein phosphatases get a makeover. *Mol. Cell.* 33, 537–545.
- Weaving, L.S., Christodoulou, J., Williamson, S.L., Friend, K.L., McKenzie, O.L., Archer, H., Evans, J., Clarke, A., Pelka, G.J., Tam, P.P., Watson, C., Lahooti, H., Ellaway, C.J., Bennetts, B., Leonard, H., Gecz, J., 2004. Mutations of CDKL5 cause a severe neurodevelopmental disorder with infantile spasms and mental retardation. *Am. J. Hum. Genet.* 75, 1079–1093.
- Yan, Z., Hsieh-Wilson, L., Feng, J., Tomizawa, K., Allen, P.B., Fienberg, A.A., Nairn, A.C., Greengard, P., 1999. Protein phosphatase 1 modulation of neostriatal AMPA channels: regulation by DARPP-32 and spinophilin. *Nat. Neurosci.* 2, 13–17.
- Zachariou, V., Benoit-Marand, M., Allen, P.B., Ingrassia, P., Fienberg, A.A., Gonon, F., Greengard, P., Picciotto, M.R., 2002. Reduction of cocaine place preference in mice lacking the protein phosphatase 1 inhibitors DARPP 32 or inhibitor 1. *Biol. Psychiatry* 51, 612–620.
- Zachariou, V., Sgambato-Faure, V., Sasaki, T., Svenningsson, P., Berton, O., Fienberg, A.A., Nairn, A.C., Greengard, P., Nestler, E.J., 2006. Phosphorylation of DARPP-32 at Threonine-34 is required for cocaine action. *Neuropsychopharmacology* 31, 555–562.

Matériels et Méthodes

Chapitre I : Procédures comportementales

A - Animaux

Des rats Wistar mâles (Elevage Janvier, Le Genest-St-Isle, France), pesant entre 150 et 175g à leur arrivée au laboratoire, sont regroupés par 4 ou 5 dans des cages standards et placés dans une pièce en cycle inversé 12h/12h (lumières allumées entre 19h et 7h) où la température et l'humidité sont maintenues constantes. Les animaux ont un accès *ad libitum* à la nourriture et à l'eau. Toutes les expériences se déroulent pendant la phase nocturne des animaux. Toutes les procédures impliquant les animaux sont menées en accord avec les directives nationales et internationales relatives à l'expérimentation animale (directive 2010/063 et décret n° 2013-118, autorisation d'expérimenter n°67-165) et les protocoles sont approuvés par le Comité Régional d'Éthique en Matière d'Expérimentation Animale de Strasbourg (CREMEAS, saisine 35).

Après deux semaines d'habituation, les animaux subissent une chirurgie visant à implanter un cathéter dans la veine jugulaire droite (Figure 37) ainsi que des guide-canules dans les ventricules latéraux [Figure 38 ; (Paxinos et Watson, 2007)]. L'anesthésie est réalisée par une injection intrapéritonéale (1 ml/kg) d'un mélange 5:1 (vol/vol) de kétamine 100 mg/ml (Imalgene 1000®, Merial) et de xylazine 2% (Rompun®, Bayer). A l'issue de la chirurgie, les sutures sont désinfectées avec une solution antiseptique (Biseptine®, Bayer) et enduites d'une pommade cicatrisante (Cicoplast®, La Roche-Posay). Un anti-inflammatoire non stéroïdien (carprofène 5mg/kg ; Rimadyl®, Pfizer) est injecté dans l'espace sous-cutané dorsal. Les animaux sont ensuite placés en cages individuelles, de manière à ce que les contacts visuels, olfactifs et acoustiques restent possibles. La récupération post-chirurgicale dure 7 à 10 jours durant lesquels les animaux sont manipulés tous les jours afin de les habituer à l'expérimentateur et d'observer leur état de santé. Suite aux opérations, les cathéters sont rincés quotidiennement avec 150 µl d'une solution de NaCl 9 ‰ contenant 100 U/ml d'héparine (Héparine Choay®, Sanofi Aventis) et 50 mg/ml d'ampicilline (Unacim®, Pfizer) afin de minimiser coagulation et infections bactériennes.

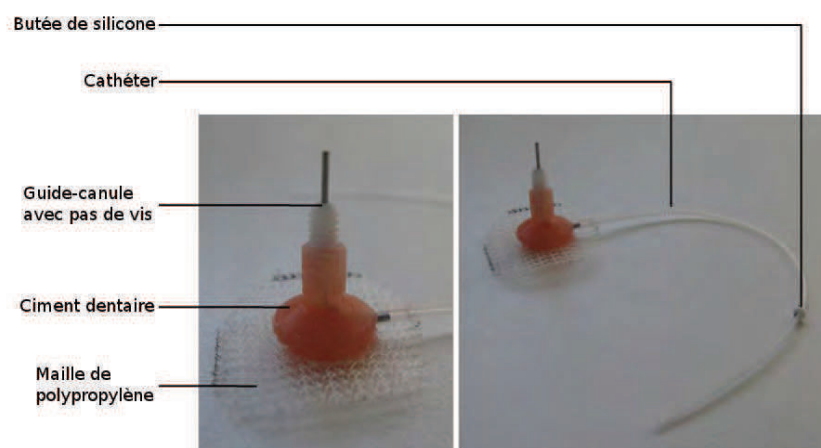


Figure 37 : Système de cathétérisation

Le montage consiste en un cathéter de silicone (0,64 mm de diamètre interne, 1,19 mm de diamètre externe et 12 cm de longueur) relié à un guide-canule (23 gauges) (Plastics One) comportant un pas de vis. Le guide-canule est courbé à angle droit, protégé par du ciment dentaire (Paladur®, Heraeus Kulzer) et fixé à un disque de maille de polypropylène (2,5 cm de diamètre) qui permet une meilleure adhérence du montage aux tissus de l'animal. Une butée de silicone est fixée à 3,6 cm de l'extrémité du cathéter afin de standardiser la longueur qui sera introduite dans la veine. Les montages sont plongés dans un bain d'alcool à 70° une demi-heure avant l'opération chirurgicale. Le système de cathétérisation est inséré dans un espace sous-cutané réalisé dans le dos, le pas de vis du guide-canule émergeant par un orifice pratiqué dans la partie médiane du dos. Un chemin sous-cutané permet d'amener l'extrémité libre du cathéter à la veine jugulaire droite de l'animal. A l'aide de ciseaux microchirurgicaux, une hémisection est pratiquée dans la veine jugulaire droite. Le cathéter est introduit sur une longueur de 3,6 cm jusqu'à l'oreillette droite du cœur, puis arrimé à la veine avec des fils de suture. Un bouchon hermétique et un manchon métallique de protection sont ensuite placés sur le guide-canule extériorisé dans le dos de l'animal.

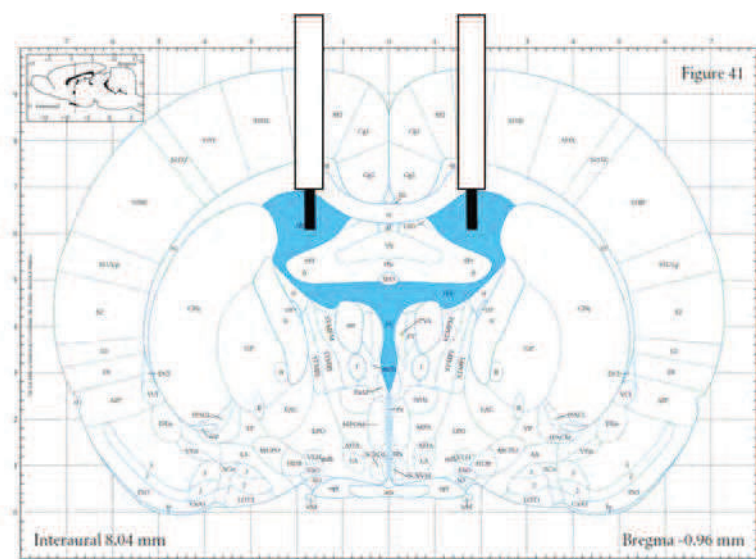


Figure 38 : Emplacement des guide-canules et canules d'injection

Immédiatement après l'implantation du cathéter, l'animal est placé dans un cadre stéréotaxique. La boîte crânienne est mise à nu et percée pour une implantation bilatérale de guides-canules (23 gauges) dans les ventricules latéraux aux coordonnées suivantes par rapport au bregma (antéro-postériorité : -0,9 mm ; médio-latéralité : $\pm 1,8$ mm ; dorso-ventralité : -3 mm) (Paxinos et Watson, 2007). La canule d'injection (noir) dépasse d'1 mm des guides-canules (blanc). Du ciment dentaire (Paladur®, Heraeus Kulzer) permet de solidariser l'os et les guides-canules. Des mandrins métalliques sont introduits dans les guides-canules afin d'éviter une remontée de liquide céphalo-rachidien, ainsi qu'une possible obstruction. Enfin, un tube en plastique fixé au ciment dentaire et équipé d'un capuchon protège l'ensemble.

B - Traitements pharmacologiques

Les inhibiteurs de DNMTs, zébularine (Sigma-Aldrich) et 5-aza-2'-désoxycytidine (Sigma-Aldrich), sont dilués dans une solution véhicule NaCl 9 % contenant 10 % de DMSO. Deux doses ont été utilisées : 0,5 et 5 µg / jour. Un volume de 5 µl de solution est injecté unilatéralement (contre-balancement quotidien) dans le système ventriculaire 20 minutes avant le début de chaque session d'AA. L'instillation dure deux minutes et la canule d'injection est ensuite laissée en place pendant une minute supplémentaire. Une injection de bleu de méthylène chez des rats contrôles suivie d'une euthanasie et de l'examen des ventricules a permis de vérifier l'exactitude du site d'injection.

NB : une solution de DMSO 10 % n'induit pas d'effet comportemental dans les différents protocoles d'AA (Romieu *et al.*, 2008).

C - Auto-administration de cocaïne

C.1 Cocaïne

Le chlorhydrate de cocaïne (Cooper, Melun, France) est dilué dans une solution saline stérile NaCl 9 %. La concentration de cocaïne est ajustée tous les trois jours en fonction du poids de chaque animal.

C.2 Appareillage

Les sessions d'AA sont réalisées dans des chambres de conditionnement opérant (30x30x30 cm) closes et obscures situées dans une pièce comportant une isolation phonique. Une potence métallique soutenant une canule tournante est fixée au sommet de la chambre et permet à l'animal de circuler librement à l'intérieur de la chambre (Figure 39).

Une pompe (Imetronic) actionnée par ordinateur permet de pousser une seringue de 10 ml reliée à la canule tournante par un cathéter en silicone. Un second cathéter protégé par un ressort métallique permet de relier la canule tournante au guide-canule implanté dans le dos de l'animal. Le volume délivré de solution de cocaïne est de 60 µl en 2 secondes.

Chaque chambre comprend deux orifices circulaires de 3 cm de diamètre séparés de 20 cm et situés à 4 cm du sol sur la même paroi. Chaque orifice contient une cellule photoélectrique

permettant de détecter l'introduction du museau de l'animal dans l'orifice (« nose-poke » ou NP). Un NP dans l'orifice dit actif entraîne une injection intraveineuse de cocaïne alors qu'un NP dans l'autre orifice (orifice inactif) est sans conséquence programmée. La position droite ou gauche de l'orifice actif est contrebalancée à l'intérieur de chaque condition expérimentale. Une lumière verte clignotante (3 Hz) située 20 cm au dessus de l'orifice actif s'allume de manière contingente à l'injection de cocaïne. Puis, la cage est illuminée pendant 40 secondes par une lumière d'ambiance blanche afin de signaler à l'animal une période réfractaire pendant laquelle il ne peut obtenir aucune injection.

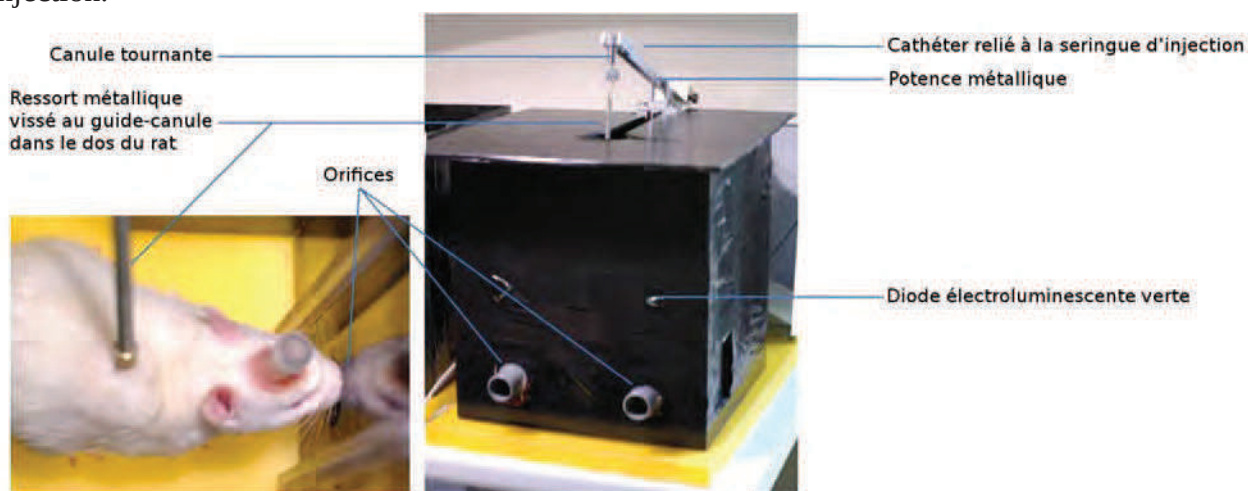


Figure 39 : Appareillage d'auto-administration

C.3 Protocoles utilisés

C.3.1 *Ratio fixe*

Dans un protocole de FR, le nombre de NPs nécessaires à l'obtention d'une injection de cocaïne est fixe pendant toute la durée d'une session d'AA. Le protocole FR1 signifie que l'animal devra réaliser 1 NP dans l'orifice actif pour obtenir une injection. Dans cette étude, les animaux sont d'abord soumis à un protocole de FR1 pendant six jours, puis le ratio est augmenté et sept jours de FR5 (5 NPs nécessaires à l'obtention d'une injection) sont réalisés. Toutes les sessions d'AA durent deux heures.

C.3.2 *Dose-réponse de cocaïne*

Dans ce protocole, la dose de cocaïne infusée à chaque injection diminue par paliers toutes les 50 minutes au sein même de chaque session quotidienne d'AA (10 minutes de pause entre chaque

dose). Les doses de cocaïne sont dans l'ordre d'apparition pendant la session d'AA : 0,75 / 0,33 / 0,25 / 0,125 et 0 mg/kg/injection. La dose 0 correspond à la solution saline stérile 9 ‰, véhicule du chlorhydrate de cocaïne. Pour des raisons techniques, les injections ICV de la solution véhicule de DMSO 10 % et de la 5-dAZA sont réalisées une heure avant chaque session de dose-réponse au lieu des 20 minutes utilisées pour les autres protocoles d'AA.

C.3.3 Ratio progressif

Dans ce protocole, le nombre de NPs nécessaires à l'obtention d'une injection de cocaïne augmente de manière exponentielle au fur et à mesure des injections. Ce nombre est déterminé par l'équation suivante (Richardson et Roberts, 1996) : $NP_{(n)} = (5e^{0,2n}) - 5$, n représentant le rang des injections successives. La durée d'une session de PR est variable. L'animal doit réaliser le nombre de NPs nécessaires à l'obtention d'une injection n dans l'heure qui suit l'injection $n-1$. S'il n'y parvient pas, la session est stoppée. La durée maximale de la session est fixée à cinq heures. A l'issue de la session, le point de rupture ou « breaking-point » (nombre de NPs requis pour obtenir la dernière injection) est déterminé, ce qui correspond au travail maximal que l'animal aura pu effectuer pour obtenir une injection supplémentaire.

C.3.4 Réactivation du comportement de recherche de cocaïne

Après 14 sessions quotidiennes d'AA sous le protocole de FR, les rats sont soumis à des périodes de deux à cinq semaines de sevrage dans leur cage de stabulation. Le jour du test, vingt minutes après l'injection de 5-dAZA, une injection intrapéritonéale de cocaïne (15 mg/kg) est effectuée immédiatement avant de placer les animaux dans leur chambre d'AA. Les NPs de l'animal ne déclenchent pas d'injection contingente de cocaïne mais déclenchent les signaux associés : diode électroluminescente verte clignotante et lumière d'ambiance blanche. Les NPs dans les deux orifices sont enregistrés pendant deux heures.

C.4 Analyse des résultats et statistiques

Les différents paramètres des sessions d'auto-administration sont enregistrés au moyen du logiciel LabView® (National Instruments) par l'intermédiaire d'une carte digitale (DIO-24, National Instruments). Les variables mesurées sont le nombre d'injections de cocaïne et le nombre de NPs dans chacun des orifices. Les données obtenues dans les différentes conditions expérimentales sont jugées statistiquement significatives au seuil $p < 0,05$ à l'aide du logiciel SigmaPlot 12 (Systat software) ; ANOVA à deux facteurs dont un à mesure répétée pour les expériences de FR et PR ou

ANOVA à trois facteurs à mesure répétée pour les expériences de dose-réponse, suivies du test post-hoc de Student-Newman-Keuls, ou encore test *t* de Student pour les expériences de rechute.

Chapitre II : Méthylation et expression

A - Prélèvement des structures cérébrales

Les animaux sont mis à mort par injection létale (500 mg/kg) de pentobarbital sodique (Doléthal®, Vétoquinol) puis décapités deux heures après la dernière session d'AA pour les analyses de méthylation des DMRs et d'expression des ARNm, 15 h après pour les analyses par Western Blot ou 24 h après pour l'analyse du méthylome. Le cerveau est très rapidement extrait de la boîte crânienne et découpé à main levée en tranches d'environ 1 mm d'épaisseur. Le CPFm et le striatum sont prélevés et immédiatement congelés dans l'azote liquide, puis conservés à -80°C.

B - Analyse de la méthylation

Concernant l'analyse du méthylome par séquençage, les CPFm ont été envoyés directement à l'entreprise Active Motif et la procédure qu'ils ont suivie est décrite dans la partie Résultats Expérimentaux Chapitre II : A.1 . Pour ce qui est de l'analyse de la méthylation des DMRs issues du méthylome, la procédure est décrite ci-dessous.

B.1 Extraction de l'ADN génomique

Les tissus sont découpés en petits morceaux et placés dans 900 µl de tampon TE9-SDS-PK. Le mélange est fortement vortexé pendant 2 à 3 minutes puis mis à incuber à 48°C. Le lendemain matin, 900 µl de phénol-chloroforme-isoamylalcool sont ajoutés et les tubes sont mélangés par retournements doux 20 à 30 fois puis centrifugés pendant 10 min à 4000 G et à température ambiante. La phase aqueuse est prélevée et une seconde extraction avec un volume de phénol-chloroforme-isoamylalcool identique à celui de la phase prélevée est pratiquée. Après centrifugation, un volume de chloroforme-isoamylalcool (en proportion 24:1) identique à celui de la phase aqueuse est ajouté. Le mélange est de nouveau centrifugé à 4000 G pendant 10 min et la phase aqueuse prélevée. Un volume d'ammonium acétate 10 M égal à 1/3 de celui de la phase aqueuse est ajouté et les tubes sont mélangés par retournement. Puis, un volume d'éthanol 100 % à

-20°C égal à 2,5 fois celui de la phase aqueuse est ajouté, les tubes sont mélangés par retournements doux et mis à -20°C jusqu'au lendemain matin. Après centrifugation à 12000 G pendant 20 min à +4°C, trois lavages à l'éthanol 75 % sont effectués, entrecoupés de centrifugations à 12000 G à +4°C pendant 10 min. Enfin, les culots sont mis à sécher puis resuspendus dans 50 µl de tampon Tris 3 mM / EDTA 1 mM à pH 7,4. La quantité et la pureté des ADNs extraits sont mesurées par densité optique au spectrophotomètre (Nanodrop®, Thermo Scientific). Tous les ADNs extraits des CPFm montrent un ratio 260/280 supérieur à 2,00 et un ratio 260/230 supérieur à 2,20. La concentration des échantillons d'ADN génomique est de l'ordre de plusieurs centaines de ng par µl. L'ADN génomique est conservé à +4°C.

Composition du tampon TE9 :

Tris pH 8,0 500 mM ; EDTA 20 mM ; NaCl 10 mM

Préparation (extemporanée) du tampon TE9-SDS-PK (pour 20 ml) :

17,5 ml de TE9 + 2 ml de SDS 10 % (concentration finale 1 %) + 0,5 ml de protéinase K
à 20 mg/ml (concentration finale 0,5 mg/ml)

Préparation du tampon phénol-chloroforme-isoamylalcool (pour 45 ml) :

15 ml de phénol-Tris pH 8,0 + 10 ml de chloroforme + 20 ml d'isoamylalcool
Agiter doucement, laisser décanter 24 h puis enlever l'eau stagnant en surface.

B.2 Sonication et enrichissement en fragments d'ADN méthylés

Après quantification, 5 µg d'ADN génomique resuspendus dans 200 µl (volume total) de Tris 10 mM pH 8 sont soniqués (Bioruptor® Plus, Diagenode). Trente cycles (30 s ON ; 90 s OFF) sont réalisés en position « LOW » à +4°C. Les tubes sont vortexés et micro-centrifugés tous les 5 cycles. La taille des fragments (inférieure à 600 paires de bases) est vérifiée sur gel d'agarose 2 % + bromure d'éthidium.

Les fragments méthylés sont ensuite enrichis à l'aide du même système que pour l'analyse du méthylome, le « MethylCollector® Ultra, Active Motif », utilisant un complexe protéique MBD2b/MBD3L1 capable de reconnaître spécifiquement les 5-mC et pas les cytosines non méthylées, ni les 5-hmC. Les protéines MBD2b étant couplées à une séquence riche en histidines, les complexes MBD-ADN méthylé sont récupérés à l'aide de billes magnétiques recouvertes de nickel et d'un aimant. Les complexes ainsi formés sont ensuite dissociés grâce à l'action de la protéinase K et la fraction contenant l'ADN méthylé est récupérée. Pour chaque échantillon, 10 µl d'ADN soniqué sont enrichis en conditions de faible stringence (« Low Salt Binding Buffer »). Les échantillons soniqués non enrichis serviront d'« inputs ». A l'issue de l'enrichissement, une purification des fragments d'ADN méthylé est effectuée en suivant les recommandations du fabricant. Une extraction phénol-chloroforme-isoamylalcool (25:24:1) est pratiquée et suivie d'une centrifugation à 12000 G pendant 5 min. La phase aqueuse est prélevée et supplémentée avec 1 µl de glycogène à 20 mg/ml, 1 volume d'ammonium acétate 5 M et 2,5 volumes d'éthanol 100 %. La précipitation se fait à -20°C pendant la nuit. Le lendemain, après centrifugation à 12000 G pendant 20 min à +4°C, deux lavages avec 500 µl d'éthanol 75 % entrecoupés de centrifugations sont effectués. Les culots sont mis à sécher et resuspendus dans 10 µl d'eau ultra-pure. La conservation des échantillons soniqués et des échantillons enrichis en ADN méthylé se fait à -20°C.

B.3 PCR quantitative

Les amorces de qPCR pour le ciblage des DMRs sont conçues à l'aide des logiciels Primer3web 4.0.0 (<http://primer3.ut.ee/>) et Primer-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Les paramètres originaux de Primer3web 4.0.0 sont utilisés : longueur comprise entre 18 et 23 nucléotides, température d'hybridation optimale comprise entre 57°C et 62°C, contenu en GC compris entre 30 et 70 %. Ces paramètres ne sont pas ajustés compte tenu de la difficulté de concevoir des couples d'amorces pour une grande majorité des DMRs. Seuls les couples ayant une très faible probabilité de former des structures secondaires et de s'hybrider de manière non spécifique sont sélectionnés. Les amorces sélectionnées (Tableau 5) sont synthétisées par Sigma-Aldrich.

Tableau 5 : Liste des amorces de qPCR pour l'analyse des DMRs

Gènes et DMRs	Sens	Séquence (5'-3')
<i>Cnrip1</i> (NC_005113.3)	F	TACAAATTTTCAAGACCCGCTG
DMR n° 57083	R	ACGAGCCTCCCTAAAAGCTG

<i>Hdac2</i> (NC_005119.3)	F	CAGCCGTCAGAGGAGATCAT
DMR n°110816	R	CCGGAATGTTGCTCGATGTT
<i>Rock1</i> (NC_005117.3)	F	TTCTGCCAATTACCCAGCGA
DMR n° 79411	R	CACCATCTTACAGGCCAGGT

La spécificité ainsi que l'absence de formation de structures secondaires de tous les couples d'amorces de qPCR est validée par la présence d'un pic de fusion unique et étroit propre à chaque amplicon lors de la PCR et d'une bande unique lors du dépôt des produits de PCR sur un gel d'agarose 2 % + bromure d'éthidium.

La réaction de qPCR est réalisée soit en capillaire dans un volume de 15 µl pour les validations d'amorces (LightCycler® 2.0, Roche), soit en plaque de 384 puits dans un volume de 12 µl pour la quantification de l'enrichissement en ADN méthylé par rapport aux « inputs », tous les échantillons étant mesurés sous forme de triplicats (LightCycler® 480, Roche).

La réaction comprend l'ADN, le mélange 5X HOT Pol EvaGreen® qPCR Mix Plus (Euromedex) et les amorces (200 nM). Le mélange 5X HOT Pol EvaGreen® qPCR Mix Plus (Euromedex) contient l'enzyme HOT Pol DNA Polymérase, le fluorochrome EvaGreen®, agent intercalant se fixant dans le sillon mineur de l'ADN, du magnésium et les désoxyribonucléotides (dNTPs) permettant la néosynthèse d'ADN.

Les conditions de qPCR sont les suivantes :

- Activation de l'enzyme HOT Pol DNA Polymérase à 95°C pendant 15 min en capillaire ou 10 min en plaque
- 50 cycles d'amplification :
 - Dénaturation à 95°C pendant 15 s
 - Hybridation des amorces à 60°C pendant 20 s
 - Élongation à 72°C pendant 25 s
- Étape de fusion permettant de déterminer la température de fusion des amplicons formés.

La validation des amorces comprend la validation de spécificité d'hybridation (voir plus haut) mais également la mesure de l'efficacité des amorces et de la qPCR. Cette mesure d'efficacité ($E = 10^{-1/\text{pente}}$) est réalisée à partir d'une gamme étalon d'ADN faite à partir d'un mélange de tous les

échantillons. Elle est fonction de la pente de la droite $C_T = \log [ADN]$ où C_T est le maximum de la dérivée seconde de la courbe de qPCR. Elle est réalisée en parallèle sur les « inputs » et les fractions enrichies en ADN méthylé. Seuls les couples d'amorces ayant une efficacité comparable et constante dans les fractions méthylées et les « inputs » sont retenus. La mesure d'efficacité permet de calculer des concentrations relatives pour chaque échantillon et le ratio fraction méthylée / input est utilisé comme variable. Les données obtenues dans les différentes conditions expérimentales sont jugées statistiquement significatives au seuil $p < 0,05$ à l'aide du logiciel SigmaPlot 12 (Systat software) ; ANOVA à deux facteurs suivie du test post-hoc de Student-Newman-Keuls.

C - Expression

C.1 RT-qPCR

C.1.1 *Extraction des ARNs et transcription inverse*

Les structures cérébrales sont broyées (Vitesse maximum pendant 20 s ; Polytron PT 10-35, Kinematica) dans 800 µl de Trizol (TRI Reagent®, Molecular Research Center, Inc) (Chomczynski et Sacchi, 1987). Après une dizaine de minutes à température ambiante, 160 µl de chloroforme sont ajoutés. Les homogénats sont alors centrifugés 10 min à 12000 G à +4°C. La phase aqueuse est prélevée et 500 µl d'isopropanol y sont ajoutés. Après précipitation durant la nuit à -20°C, les échantillons sont centrifugés 15 min à 12000 G à +4°C. Les culots d'ARN sont lavés deux fois avec 1 ml d'éthanol à 75 % (centrifugations 10 min, 12000 G, +4°C) puis mis à sécher et enfin resuspendus dans 40 µl d'eau ultra-pure en incubant 5 min à 60°C. La quantité et la pureté des ARNs extraits sont mesurées par densité optique au spectrophotomètre (Nanodrop®, Thermo Scientific). Tous les ARNs extraits des CPFm montrent un ratio 260/280 supérieur à 1,86 et un ratio 260/230 supérieur à 2,28. La concentration des échantillons est de l'ordre de 1 à 2 µg/µl. Les ARNs sont conservés à -80°C.

La synthèse d'ADN complémentaire ou transcription inverse est réalisée à partir de 500 ng d'ARN repris dans 5 µl d'eau ultra-pure. Un premier mélange comprenant l'ARN, 1 µl de dNTP (10 mM chacun) et 0,6 µl d'hexanucléotides aléatoires (100 µM) dans un volume final de 12 µl est dénaturé à 68°C pendant 10 minutes avant refroidissement sur glace pendant 5 minutes. Dans une deuxième étape, le tampon de réaction du fournisseur (Euromedex), contenant du dithiothréitol (DTT) et du magnésium, est ajouté et les tubes incubés 2 minutes à température ambiante.

L'enzyme (100 U, M-MLV RT RNase H Minus DNA Polymérase, Euromedex) est alors additionnée et les tubes incubés 10 min à température ambiante. La réaction de transcription inverse est réalisée à 37°C pendant 1 heure et stoppée 15 min à 70°C. Les ADN complémentaires sont conservés à -20°C.

C.1.2 PCR quantitative

Les amorces de qPCR sont conçues à l'aide des logiciels Primer3web 4.0.0 (<http://primer3.ut.ee/>) et Primer-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Les paramètres originaux des logiciels sont ajustés par rapport à la conception des amorces pour l'analyse de méthylation. La longueur est toujours de l'ordre d'une vingtaine de nucléotides, la température d'hybridation optimale est proche de 60°C, le contenu en GC compris entre 45 et 55 % et dans la mesure du possible les deux amorces doivent s'hybrider sur deux exons différents. Seuls les couples ayant une très faible probabilité de former des structures secondaires et de s'hybrider de manière non spécifique sont sélectionnés. Les amorces sélectionnées (Tableau 6) sont synthétisées par Sigma-Aldrich. NB : les amorces pour *Cnrip1* ont été conçues par (Bojnik *et al.*, 2012).

Tableau 6 : Liste des amorces de qPCR utilisées pour mesurer l'expression des gènes

Gènes	Sens	Séquence (5'-3')
<i>Agap2</i> NM_023026.2	F	CCAAGCGCAAAATGTGGAAAC
	R	CCTCAAAGTGCCACGTCTGA
<i>Arf6</i> NM_024152.2	F	AATGACCGGGAGATGAGGGA
	R	CCAGTTCCTGTCCCGAATCC
<i>Arhgef6</i> NM_001005565.1	F	CGACCTGCACCTCCACTTAG
	R	TCTTCATCGTTTTGGGGCTCT
<i>Arhgef9</i> NM_023957.1	F	GCGAGATAGGACCCTGCTTC
	R	CTCGGCCAATTGTAAGGGGT
<i>Cnrip1</i> NM_001014232.1	F	TTCCCGCATCTCTTTGTCT
	R	GTCCCGTTTACCGCTGTTTA
<i>Clta</i> NM_031974.1	F	GAATGGCGAATACTACCAGG
	R	GCCTTTTCTTTCCACTCTGC
<i>Hdac2</i> NM_053447.1	F	CCCTCAAACATGACAAACCA
	R	TGTCAGGGTCTTCTCCATCC

<i>Ip6k2</i>	F	GAAGCACCGGAACCAGTACA
NM_021660.2	R	ACACTCGAACGCCAATGACT
<i>Lcor</i>	F	GGTCTCATCCCCAACAGCAA
XM_006231415.1	R	GCTTCCACCTGTCAGAACCA
<i>Mapk6</i>	F	CGACATGACTGAGCCACACA
NM_031622.2	R	AAAGTGCTTCCTCGGCTGTC
<i>Pak3</i>	F	TCCTCGGGATGGATGGTTCT
NM_019210.1	R	GGCCATGATTCCCAGAGACC
<i>Reln</i>	F	GCAATCCATCCTTCCACCTC
NM_080394.2	R	GCTTCACAACCCACCACAA
<i>Rock1</i>	F	AGTTGGCTCGAGGAATTCTGG
NM_031098.1	R	TCTTTGGTTAGCGCATTGTTTG
<i>Tet1</i>	F	ATCCCACTGACCGAAGATGT
XM_006256398.1	R	CGAACAGCCAAAGGAGAAAG

La spécificité ainsi que l'absence de formation de structures secondaires de tous les couples d'amorces de qPCR est validée par la présence d'un pic de fusion unique et étroit propre à chaque amplicon lors de la PCR et d'une bande unique lors du dépôt des produits de PCR sur un gel d'agarose 2 % + bromure d'éthidium.

Le protocole de qPCR est similaire à celui utilisé pour l'analyse de la méthylation (voir B.3) si ce n'est que le temps d'élongation à chaque cycle est de 20 s, les amplicons n'excédant pas 250 paires de bases. La chaîne légère A de la clathrine (*Clta*) est utilisée comme gène de référence. Le ratio gène cible / gène de référence est utilisé comme variable. Les données obtenues dans les différentes conditions expérimentales sont jugées statistiquement significatives au seuil $p < 0,05$ à l'aide du logiciel SigmaPlot 12 (Systat software) ; ANOVA à deux facteurs suivie du test post-hoc de Student-Newman-Keuls.

C.2 Western Blot

C.2.1 Extraction de la fraction nucléaire

Les structures cérébrales sont broyées (2000 rpm pendant 1 min ; RZR 2102 control, Heidolph) dans 500 μ l de tampon d'homogénéisation. Les tubes sont centrifugés à 1000 G pendant

20 min à +4°C et le culot est repris dans 400 à 500 µl de tampon Tris-EDTA-DTT (1000 rpm pendant 30 s ; RZR 2102 control, Heidolph). Les échantillons sont conservés à -20°C.

Composition du tampon d'homogénéisation :

HEPES pH 7,9 20 mM ; EDTA 0,2 mM ; Dithiothréitol (DTT) 0,5 mM ;

Phénylméthylsulfonylfluoride (PMSF) 0,5 mM ; KCl 0,1 M ; Glycérol 20 %

Composition du tampon Tris-EDTA-DTT :

Tris pH 7,9 10 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 0,1 mM

C.2.2 Dosage des protéines

La concentration des protéines de la fraction nucléaire est déterminée par la méthode de Bradford basée sur l'absorption à 595 nm du Bleu de Coomassie G-250 (Bradford, 1976). Deux µl d'extrait protéique nucléaire sont ajoutés à 1 ml de solution contenant 20 % de réactif de Bradford (Biorad Protein Assay, BIO-RAD). Les protéines sont quantifiées à l'aide d'une gamme d'étalonnage en quantités croissantes (1 à 8 µg) réalisée dans les mêmes conditions avec de l'albumine sérique bovine (Euromedex).

C.2.3 Immunoblot

La séparation des protéines est réalisée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). Vingt µg de protéines sont repris dans un tampon de charge, bouillis pendant 5 min puis déposés dans les puits. Un marqueur de poids moléculaire est déposé à chaque extrémité des gels (Protein Ladder Plus, Euromedex). La migration se fait en deux temps : 60 V durant la migration à travers le gel de concentration puis 100 V à travers le gel de séparation. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose (GE Healthcare) pendant une heure à 300 mA. Afin de s'assurer du bon transfert des protéines, la membrane est colorée au Rouge Ponceau, photographiée, puis rincée à l'eau distillée. Dans le but d'éviter tout marquage non spécifique, la membrane est incubée pendant une heure à température ambiante dans une solution de saturation. Elle est ensuite coupée et incubée à 4°C pendant la nuit dans 2 ml de solution de saturation en présence soit de l'anticorps primaire anti-HDAC2 dilué au 1/2000^{ème} (Millipore anti-HDAC2, clone Y461, anticorps monoclonal de lapin, Cat # 04-229), soit de l'anticorps primaire anti-GAPDH dilué au 1/2000^{ème} (Abcam anti-glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase,

anticorps polyclonal de lapin, ab22555). Après trois lavages de 10 min dans du PBS-Tween 20 0,1 %, la membrane est incubée pendant une heure à température ambiante dans 25 ml de solution de saturation en présence d'un anticorps secondaire d'âne anti-lapin biotinylé dilué au 1/50000^{ème} (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc). Après trois lavages de 10 min dans du PBS-Tween 20 0,1 % puis trois lavages à l'eau distillée, l'immunomarquage est révélé par chimioluminescence (Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare) et exposé sur un film photographique (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare) pendant 15 à 45 secondes. La quantification est réalisée par densitométrie avec l'outil « Analyse de gel » du logiciel ImageJ 1.48 (NIH). Le ratio HDAC2 / GAPDH est utilisé comme variable. Les données obtenues dans les différentes conditions expérimentales sont jugées statistiquement significatives au seuil $p < 0,05$ à l'aide du logiciel SigmaPlot 12 (Systat software) ; test de Mann-Whitney-Wilcoxon.

Composition du tampon de charge (4X) :

Tris pH 6,8 100 mM ; SDS 4 % ; DTT 20 mM ; Bleu de bromophénol 0,2 % ; Glycérol 20 %

Composition du gel de concentration :

Tris pH 6,8 125 mM ; Acrylamide / Bis-Acrylamide 4 % ; SDS 0,1 % ;

Persulfate d'ammonium 0,05 % ; TEMED 0,1 %

Composition du gel de séparation :

Tris pH 8,8 375 mM ; Acrylamide / Bis-Acrylamide 10 % ; SDS 0,1 % ;

Persulfate d'ammonium 0,05 % ; TEMED 0,05%

Composition du tampon d'électrophorèse (1X) :

Tris 25 mM pH 8,3 ; glycine 192 mM ; SDS 0,1 %

Composition du tampon de transfert (1X) :

Tris 25 mM pH 8,3 ; glycine 192 mM ; SDS 0,1 % ; méthanol 20 %

Composition de la solution de coloration au Rouge Ponceau :

Rouge Ponceau S 0,1 %, acide acétique 5 %

Composition de la solution de saturation :

I-Block 0,2 % (Tropix, Applied Biosystems) ; PBS 1X ; Tween 20 0,1 %

Références

Bibliographiques

A

- Aapola U, Shibuya K, Scott HS, Ollila J, Vihinen M, Heino M, Shintani A, Kawasaki K, Minoshima S, Krohn K, Antonarakis SE, Shimizu N, Kudoh J, Peterson P (2000) Isolation and Initial Characterization of a Novel Zinc Finger Gene, DNMT3L, on 21q22.3, Related to the Cytosine-5-Methyltransferase 3 Gene Family. *Genomics* 65:293–298.
- Aird D, Ross MG, Chen W-S, Danielsson M, Fennell T, Russ C, Jaffe DB, Nusbaum C, Gnirke A (2011) Analyzing and minimizing PCR amplification bias in Illumina sequencing libraries. *Genome Biol* 12:R18.
- Aley KO, Kulkarni SK (1990) Effect of baclofen, a GABAB-agonist, on forced swimming-induced immobility in mice. *Arch Int Pharmacodyn Thérapie* 307:18–31.
- Allen KR (2011) Screening for drugs of abuse: which matrix, oral fluid or urine? *Ann Clin Biochem* 48:531–541.
- Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE (1964) Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 51:786–794.
- Amara SG, Kuhar MJ (1993) Neurotransmitter transporters: recent progress. *Annu Rev Neurosci* 16:73–93.
- American Psychiatric Association (2013) Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 5th ed. Arlington, VA: American Psychiatric Publishing.
- 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.
- Anier K, Malinovskaja K, Aonurm-Helm A, Zharkovsky A, Kalda A (2010) DNA methylation regulates cocaine-induced behavioral sensitization in mice. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol* 35:2450–2461.
- An W (2007) Histone Acetylation And Methylation. In: *Chromatin and Disease* (Kundu TK, Bittman R, Dasgupta D, Engelhardt H, Flohe L, Herrmann H, Holzenburg A, Nasheuer H-P, Rottem S, Wyss M, Zwickl P, eds), pp 355–374 *Subcellular Biochemistry*. Springer Netherlands.
- Aran D, Hellman A (2013) DNA Methylation of Transcriptional Enhancers and Cancer Predisposition. *Cell* 154:11–13.
- Aran D, Sabato S, Hellman A (2013) DNA methylation of distal regulatory sites characterizes dysregulation of cancer genes. *Genome Biol* 14:R21.
- Aran D, Toperoff G, Rosenberg M, Hellman A (2011) Replication timing-related and gene body-specific methylation of active human genes. *Hum Mol Genet* 20:670–680.
- Ardila A, Rosselli M, Strumwasser S (1991) Neuropsychological deficits in chronic cocaine abusers. *Int J Neurosci* 57:73–79.
- 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.
- Arpin-Bott M-P, Dietrich J-B, Dirrig-Grosch S, Aunis D, Zwiller J (2006) Induction by cocaine of the serotonergic 5-HT₃ receptor in rat cerebellum. *Ann N Y Acad Sci* 1074:382–389.
- Ausio J, van Holde KE (1986) Histone hyperacetylation: its effects on nucleosome conformation and stability. *Biochemistry (Mosc)* 25:1421–1428.
- Avvakumov N, Nourani A, Côté J (2011) Histone chaperones: modulators of chromatin marks. *Mol Cell* 41:502–514.

B

- Ballon N, Leroy S, Roy C, Bourdel MC, Charles-Nicolas A, Krebs MO, Poirier MF (2006) (AAT)_n repeat in the cannabinoid receptor gene (CNR1): association with cocaine addiction in an African-Caribbean population. *Pharmacogenomics J* 6:126–130.

- Balopole DC, Hansult CD, Dorph D (1979) Effect of cocaine on food intake in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 64:121–122.
- Barker DJ, Root DH, Ma S, Jha S, Megehee L, Pawlak AP, West MO (2010) Dose-dependent differences in short ultrasonic vocalizations emitted by rats during cocaine self-administration. *Psychopharmacology (Berl)* 211:435–442.
- Barker DJ, Simmons SJ, Servilio LC, Bercovicz D, Ma S, Root DH, Pawlak AP, West MO (2013) Ultrasonic vocalizations: evidence for an affective opponent process during cocaine self-administration. *Psychopharmacology (Berl)*.
- 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.
- Barros M, Dempster EL, Illott N, Chabrawi S, Maior RS, Tomaz C, Silva MADS, Huston JP, Mill J, Müller CP (2013) Decreased methylation of the NK3 receptor coding gene (TACR3) after cocaine-induced place preference in marmoset monkeys. *Addict Biol* 18:452–454.
- Basu R, Zhang L-F (2011) X chromosome inactivation: A silence that needs to be broken. *genesis* 49:821–834.
- Ba W, van der Raadt J, Nadif Kasri N (2013) Rho GTPase signaling at the synapse: Implications for intellectual disability. *Exp Cell Res* 319:2368–2374.
- Belotserkovskii BP, Mirkin SM, Hanawalt PC (2013) DNA sequences that interfere with transcription: implications for genome function and stability. *Chem Rev* 113:8620–8637.
- Bergman J, Madras BK, Johnson SE, Spealman RD (1989) Effects of cocaine and related drugs in nonhuman primates. III. Self-administration by squirrel monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* 251:150–155.
- Bernstein E, Allis CD (2005) RNA meets chromatin. *Genes Dev* 19:1635–1655.
- 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.
- Berridge KC, Robinson TE, Aldridge JW (2009) Dissecting components of reward: “liking”, “wanting”, and learning. *Curr Opin Pharmacol* 9:65–73.
- Bestor T, Laudano A, Mattaliano R, Ingram V (1988) Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases. *J Mol Biol* 203:971–983.
- Bethge N, Lothe RA, Honne H, Andresen K, Trøen G, Eknæs M, Liestøl K, Holte H, Delabie J, Smeland EB, Lind GE (2014) Colorectal cancer DNA methylation marker panel validated with high performance in Non-Hodgkin lymphoma. *Epigenetics Off J DNA Methylation Soc* 9:428–436.
- Bettecken T, Frenkel ZM, Trifonov EN (2011) Human nucleosomes: special role of CG dinucleotides and Alu-nucleosomes. *BMC Genomics* 12:273.
- Betts L, Xiang S, Short SA, Wolfenden R, Carter CW (1994) Cytidine deaminase. The 2.3 Å crystal structure of an enzyme: transition-state analog complex. *J Mol Biol* 235:635–656.
- Bhattacharya SK, Ramchandani S, Cervoni N, Szyf M (1999) A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. *Nature* 397:579–583.
- Bird A (2007) Perceptions of epigenetics. *Nature* 447:396–398.
- Bird AP (1980) DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA. *Nucleic Acids Res* 8:1499–1504.
- Bird AP (1995) Gene number, noise reduction and biological complexity. *Trends Genet* 11:94–100.
- Blume LC, Bass CE, Childers SR, Dalton GD, Roberts DCS, Richardson JM, Xiao R, Selley DE, Howlett AC (2013) Striatal CB1 and D2 receptors regulate expression of each other, CRIP1A and δ opioid systems. *J Neurochem* 124:808–820.
- Bojnik E, Turunç E, Armağan G, Kanit L, Benyhe S, Yalçın A, Borsodi A (2012) Changes in the cannabinoid (CB1) receptor expression level and G-protein activation in kainic acid induced seizures. *Epilepsy Res* 99:64–68.

- Bostick M, Kim JK, Estève P-O, Clark A, Pradhan S, Jacobsen SE (2007) UHRF1 Plays a Role in Maintaining DNA Methylation in Mammalian Cells. *Science* 317:1760–1764.
- Bourc'his D, Xu GL, Lin CS, Bollman B, Bestor TH (2001) Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science* 294:2536–2539.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254.
- Brodeur J, Toussaint M (2007) *Biologie moléculaire: Concepts, techniques, applications*. Centre Collegial de Developpement de Materiel Didactique.
- Brodsky AS, Meyer CA, Swinburne IA, Hall G, Keenan BJ, Liu XS, Fox EA, Silver PA (2005) Genomic mapping of RNA polymerase II reveals sites of co-transcriptional regulation in human cells. *Genome Biol* 6:R64.
- Broide RS, Redwine JM, Aftahi N, Young W, Bloom FE, Winrow CJ (2007) Distribution of histone deacetylases 1-11 in the rat brain. *J Mol Neurosci* 31:47–58.
- Brownell JE, Zhou J, Ranalli T, Kobayashi R, Edmondson DG, Roth SY, Allis CD (1996) Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* 84:843–851.
- C**
- Cahill E, Salery M, Vanhoutte P, Caboche J (2014) Convergence of dopamine and glutamate signaling onto striatal ERK activation in response to drugs of abuse. *Neuropharmacology* 4:172.
- Caine S, Lintz R, Koob G (1993) Intravenous drug self-administration techniques in animals. In: *Behavioural Neuroscience, A Practical Approach*, Oxford., pp 117–143. New York: IRL Press.
- Car H, Wiśniewska RJ (2006) Antidepressant-like effects of baclofen and LY367385 in the forced swim test in rats. *Pharmacol Rep PR* 58:758–764.
- Carouge D, Host L, Aunis D, Zwiller J, Anglard P (2010) CDKL5 is a brain MeCP2 target gene regulated by DNA methylation. *Neurobiol Dis* 38:414–424.
- Cassel S, Carouge D, Gensburger C, Anglard P, Burgun C, Dietrich J-B, Aunis D, Zwiller J (2006) Fluoxetine and cocaine induce the epigenetic factors MeCP2 and MBD1 in adult rat brain. *Mol Pharmacol* 70:487–492.
- Chakko S (2002) Arrhythmias associated with cocaine abuse. *Card Electrophysiol Rev* 6:168–169.
- Champion C, Guianvarc'h D, Sénamaud-Beaufort C, Jurkowska RZ, Jeltsch A, Ponger L, Arimondo PB, Guieysse-Peugeot A-L (2010) Mechanistic insights on the inhibition of c5 DNA methyltransferases by zebularine. *PloS One* 5:e12388.
- Chan CB, Chen Y, Liu X, Tang X, Lee CW, Mei L, Ye K (2011) PIKE-mediated PI3-kinase activity is required for AMPA receptor surface expression. *EMBO J* 30:4274–4286.
- Chen C-C, Wang K-Y, Shen C-KJ (2012) The mammalian de novo DNA methyltransferases DNMT3A and DNMT3B are also DNA 5-hydroxymethylcytosine dehydroxymethylases. *J Biol Chem* 287:33116–33121.
- Cheng JC, Matsen CB, Gonzales FA, Ye W, Greer S, Marquez VE, Jones PA, Selker EU (2003) Inhibition of DNA methylation and reactivation of silenced genes by zebularine. *J Natl Cancer Inst* 95:399–409.
- Chen R, Tilley MR, Wei H, Zhou F, Zhou F-M, Ching S, Quan N, Stephens RL, Hill ER, Nottoli T, Han DD, Gu HH (2006) Abolished cocaine reward in mice with a cocaine-insensitive dopamine transporter. *Proc Natl Acad Sci* 103:9333–9338.
- Chodavarapu RK, Feng S, Bernatavichute YV, Chen P-Y, Stroud H, Yu Y, Hetzel JA, Kuo F, Kim J, Cokus SJ, Casero D, Bernal M, Huijser P, Clark AT, Krämer U, Merchant SS, Zhang X, Jacobsen SE, Pellegrini M (2010) Relationship between nucleosome positioning and DNA methylation. *Nature* 466:388–392.

- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156–159.
- Chong Y, Mia-Jan K, Ryu H, Abdul-Ghafar J, Munkhdelger J, Lkhagvadorj S, Jung SY, Lee M, Ji S-Y, Choi E, Cho M-Y (2014) DNA methylation status of a distinctively different subset of genes is associated with each histologic Lauren classification subtype in early gastric carcinogenesis. *Oncol Rep* 31:2535–2544.
- Choy JS, Lee T-H (2012) Structural dynamics of nucleosomes at single molecule resolution. *Trends Biochem Sci* 37:425–435.
- Choy JS, Wei S, Lee JY, Tan S, Chu S, Lee T-H (2010) DNA methylation increases nucleosome compaction and rigidity. *J Am Chem Soc* 132:1782–1783.
- 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.
- Comings DE, Muhleman D, Gade R, Johnson P, Verde R, Saucier G, MacMurray J (1997) Cannabinoid receptor gene (CNR1): association with i.v. drug use. *Mol Psychiatry* 2:161–168.
- Cooper DM, Bier-Laning CM, Halford MK, Ahlijanian MK, Zahniser NR (1986) Dopamine, acting through D-2 receptors, inhibits rat striatal adenylate cyclase by a GTP-dependent process. *Mol Pharmacol* 29:113–119.
- Coulondre C, Miller JH, Farabaugh PJ, Gilbert W (1978) Molecular basis of base substitution hotspots in *Escherichia coli*. *Nature* 274:775–780.
- D**
- Dalton SR, Bellacosa A (2012) DNA demethylation by TDG. *Epigenomics* 4:459–467.
- Datta J, Ghoshal K, Motiwala T, Jacob ST (2012) Novel Insights into the Molecular Mechanism of Action of DNA Hypomethylating Agents: Role of Protein Kinase C δ in Decitabine-Induced Degradation of DNA Methyltransferase 1. *Genes Cancer* 3:71–81.
- Day JJ, Childs D, Guzman-Karlsson MC, Kibe M, Moulden J, Song E, Tahir A, Sweatt JD (2013) DNA methylation regulates associative reward learning. *Nat Neurosci* 16:1445–1452.
- Day JJ, Sweatt JD (2011) Epigenetic Mechanisms in Cognition. *Neuron* 70:813–829.
- Deaton AM, Bird A (2011) CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev* 25:1010–1022.
- De Koning APJ, Gu W, Castoe TA, Batzer MA, Pollock DD (2011) Repetitive Elements May Comprise Over Two-Thirds of the Human Genome. *PLoS Genet* 7:e1002384.
- De Lima MS, de Oliveira Soares BG, Reisser AAP, Farrell M (2002) Pharmacological treatment of cocaine dependence: a systematic review. *Addict Abingdon Engl* 97:931–949.
- De Meyer T, Mampaey E, Vlemmix M, Denil S, Trooskens G, Renard J-P, De Keulenaer S, Dehan P, Menschaert G, Van Criekinge W (2013) Quality Evaluation of Methyl Binding Domain Based Kits for Enrichment DNA-Methylation Sequencing. *PLoS ONE* 8:e59068.
- Deneau G, Yanagita T, Seevers MH (1969) Self-administration of psychoactive substances by the monkey. *Psychopharmacologia* 16:30–48.
- Deng JV, Rodriguiz RM, Hutchinson AN, Kim I-H, Wetsel WC, West AE (2010) MeCP2 in the nucleus accumbens contributes to neural and behavioral responses to psychostimulants. *Nat Neurosci* 13:1128–1136.
- Deroche-Gamonet V, Belin D, Piazza PV (2004) Evidence for addiction-like behavior in the rat. *Science* 305:1014–1017.
- Detich N, Bovenzi V, Szyf M (2003) Valproate induces replication-independent active DNA demethylation. *J Biol Chem* 278:27586–27592.
- Di Chiara G, Imperato A (1988) Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:5274–5278.
- Diekmann S (1987) DNA methylation can enhance or induce DNA curvature. *EMBO J* 6:4213–4217.

- Dohm JC, Lottaz C, Borodina T, Himmelbauer H (2008) Substantial biases in ultra-short read data sets from high-throughput DNA sequencing. *Nucleic Acids Res* 36:e105.
- Doi M, Hirayama J, Sassone-Corsi P (2006) Circadian Regulator CLOCK Is a Histone Acetyltransferase. *Cell* 125:497–508.
- Dong E, Guidotti A, Grayson DR, Costa E (2007) Histone hyperacetylation induces demethylation of reelin and 67-kDa glutamic acid decarboxylase promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:4676–4681.
- Dong E, Nelson M, Grayson DR, Costa E, Guidotti A (2008) Clozapine and sulpiride but not haloperidol or olanzapine activate brain DNA demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:13614–13619.
- Dubos A, Combeau G, Bernardinelli Y, Barnier J-V, Hartley O, Gaertner H, Boda B, Muller D (2012) Alteration of synaptic network dynamics by the intellectual disability protein PAK3. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 32:519–527.
- Dujardin G, Lafaille C, de la Mata M, Marasco LE, Muñoz MJ, Le Jossic-Corcus C, Corcos L, Kornblihtt AR (2014) How Slow RNA Polymerase II Elongation Favors Alternative Exon Skipping. *Mol Cell* 54:683–690.

E

- Echeverry-Alzate V, Giné E, Bühler KM, Calleja-Conde J, Olmos P, Gorriti MA, Nadal R, Rodríguez de Fonseca F, López-Moreno JA (2014) The Effects of Topiramate on Ethanol-Cocaine Interactions and DNA Methyltransferase Gene Expression in the Rat Prefrontal Cortex. *Br J Pharmacol*.
- Ehrlich M, Buchanan KL, Tsien F, Jiang G, Sun B, Uicker W, Weemaes CMR, Smeets D, Sperling K, Belohradsky BH, Tommerup N, Misek DE, Rouillard J-M, Kuick R, Hanash SM (2001) DNA methyltransferase 3B mutations linked to the ICF syndrome cause dysregulation of lymphogenesis genes. *Hum Mol Genet* 10:2917–2931.
- Everitt BJ, Robbins TW (2005) Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nat Neurosci* 8:1481–1489.

F

- Feng J, Chang H, Li E, Fan G (2005) Dynamic expression of de novo DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b in the central nervous system. *J Neurosci Res* 79:734–746.
- Feng J, Fan G (2009) Chapter 4 - The Role of DNA Methylation in the Central Nervous System and Neuropsychiatric Disorders. In: *International Review of Neurobiology (Xiao-Hong Lu, ed)*, pp 67–84 *Novel Approaches to Studying Basal Ganglia and Related Neuropsychiatric Disorders*. Academic Press.
- Feng J, Zhou Y, Campbell SL, Le T, Li E, Sweatt JD, Silva AJ, Fan G (2010) Dnmt1 and Dnmt3a maintain DNA methylation and regulate synaptic function in adult forebrain neurons. *Nat Neurosci* 13:423–430.
- Feng Q, Zhang Y (2001) The MeCP1 complex represses transcription through preferential binding, remodeling, and deacetylating methylated nucleosomes. *Genes Dev* 15:827–832.
- Filip M, Alenina N, Bader M, Przegaliński E (2010) REVIEW: Behavioral evidence for the significance of serotonergic (5-HT) receptors in cocaine addiction. *Addict Biol* 15:227–249.
- Finch JT, Klug A (1976) Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:1897–1901.
- Fischle W, Wang Y, Allis CD (2003) Binary switches and modification cassettes in histone biology and beyond. *Nature* 425:475–479.
- Flanagan JM, Wild L (2007) An epigenetic role for noncoding RNAs and intragenic DNA methylation. *Genome Biol* 8:307.
- Flores K, Wolschin F, Corneveaux JJ, Allen AN, Huentelman MJ, Amdam GV (2012) Genome-wide association between DNA methylation and alternative splicing in an invertebrate. *BMC Genomics* 13:480.

- Flotho C, Claus R, Batz C, Schneider M, Sandrock I, Ihde S, Plass C, Niemeyer CM, Lübbert M (2009) The DNA methyltransferase inhibitors azacitidine, decitabine and zebularine exert differential effects on cancer gene expression in acute myeloid leukemia cells. *Leukemia* 23:1019–1028.
- Foltin RW, Ward AS, Collins ED, Haney M, Hart CL, Fischman MW (2003) The effects of venlafaxine on the subjective, reinforcing, and cardiovascular effects of cocaine in opioid-dependent and non-opioid-dependent humans. *Exp Clin Psychopharmacol* 11:123–130.
- Foulks JM, Parnell KM, Nix RN, Chau S, Swierczek K, Saunders M, Wright K, Hendrickson TF, Ho K-K, McCullar MV, Kanner SB (2012) Epigenetic Drug Discovery Targeting DNA Methyltransferases. *J Biomol Screen* 17:2–17.
- Fragou D, Zanos P, Kouidou S, Njau S, Kitchen I, Bailey A, Kovatsi L (2013) Effect of chronic heroin and cocaine administration on global DNA methylation in brain and liver. *Toxicol Lett* 218:260–265.
- 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.
- G**
- Gardiner-Garden M, Frommer M (1987) CpG Islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* 196:261–282.
- Garner MM, Felsenfeld G (1987) Effect of Z-DNA on nucleosome placement. *J Mol Biol* 196:581–590.
- Gawin FH, Ellinwood EH Jr (1988) Cocaine and other stimulants. Actions, abuse, and treatment. *N Engl J Med* 318:1173–1182.
- Gawin FH, Kleber HD (1986) Abstinence symptomatology and psychiatric diagnosis in cocaine abusers. Clinical observations. *Arch Gen Psychiatry* 43:107–113.
- Geiman TM, Sankpal UT, Robertson AK, Zhao Y, Zhao Y, Robertson KD (2004) DNMT3B interacts with hSNF2H chromatin remodeling enzyme, HDACs 1 and 2, and components of the histone methylation system. *Biochem Biophys Res Commun* 318:544–555.
- Ghoshal K, Datta J, Majumder S, Bai S, Kutay H, Motiwala T, Jacob ST (2005) 5-Aza-deoxycytidine induces selective degradation of DNA methyltransferase 1 by a proteasomal pathway that requires the KEN box, bromo-adjacent homology domain, and nuclear localization signal. *Mol Cell Biol* 25:4727–4741.
- Glatz AC, Ehrlich M, Bae RS, Clarke MJ, Quinlan PA, Brown EC, Rada P, Hoebel BG (2002) Inhibition of cocaine self-administration by fluoxetine or D-fenfluramine combined with phentermine. *Pharmacol Biochem Behav* 71:197–204.
- Glozak MA, Sengupta N, Zhang X, Seto E (2005) Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene* 363:15–23.
- Goll MG, Kirpekar F, Maggert KA, Yoder JA, Hsieh C-L, Zhang X, Golic KG, Jacobsen SE, Bestor TH (2006) Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA Methyltransferase Homolog Dnmt2. *Science* 311:395–398.
- Gong F, Miller KM (2013) Mammalian DNA repair: HATs and HDACs make their mark through histone acetylation. *Mutat Res Mol Mech Mutagen* 750:23–30.
- Goodman A (1990) Addiction: definition and implications. *Br J Addict* 85:1403–1408.
- Gorelick DA (2012) Pharmacokinetic strategies for treatment of drug overdose and addiction. *Future Med Chem* 4:227–243.
- Gowher H, Liebert K, Hermann A, Xu G, Jeltsch A (2005) Mechanism of Stimulation of Catalytic Activity of Dnmt3A and Dnmt3B DNA-(cytosine-C5)-methyltransferases by Dnmt3L. *J Biol Chem* 280:13341–13348.
- Grakalic I, Panlilio LV, Quiroz C, Schindler CW (2010) Effects of orbitofrontal cortex lesions on cocaine self-administration. *Neuroscience* 165:313–324.

- Grayson DR, Guidotti A (2013) The dynamics of DNA methylation in schizophrenia and related psychiatric disorders. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol* 38:138–166.
- Grimm JW, Hope BT, Wise RA, Shaham Y (2001) Neuroadaptation. Incubation of cocaine craving after withdrawal. *Nature* 412:141–142.
- Grokhovskii SL (2006) [The specific cleavage of DNA with ultrasound]. *Mol Biol (Mosk)* 40:317–325.
- Grokhovsky SL, Il'icheva IA, Nechipurenko DY, Golovkin MV, Panchenko LA, Polozov RV, Nechipurenko YD (2011) Sequence-specific ultrasonic cleavage of DNA. *Biophys J* 100:117–125.
- Guan J-S, Haggarty SJ, Giacometti E, Dannenberg J-H, Joseph N, Gao J, Nieland TJE, Zhou Y, Wang X, Mazitschek R, Bradner JE, DePinho RA, Jaenisch R, Tsai L-H (2009) HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature* 459:55–60.
- Guo JU, Ma DK, Mo H, Ball MP, Jang M-H, Bonaguidi MA, Balazer JA, Eaves HL, Xie B, Ford E, Zhang K, Ming G, Gao Y, Song H (2011a) Neuronal activity modifies the DNA methylation landscape in the adult brain. *Nat Neurosci* 14:1345–1351.
- Guo JU, Su Y, Shin JH, Shin J, Li H, Xie B, Zhong C, Hu S, Le T, Fan G, Zhu H, Chang Q, Gao Y, Ming G, Song H (2014) Distribution, recognition and regulation of non-CpG methylation in the adult mammalian brain. *Nat Neurosci* 17:215–222.
- Guo JU, Su Y, Zhong C, Ming G, Song H (2011b) Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell* 145:423–434.
- Hameed UFS, Lim J, Zhang Q, Wasik MA, Yang D, Swaminathan K (2014) Transcriptional Repressor Domain of MBD1 is Intrinsically Disordered and Interacts with its Binding Partners in a Selective Manner. *Sci Rep* 4:4896.
- Han DD, Gu HH (2006) Comparison of the monoamine transporters from human and mouse in their sensitivities to psychostimulant drugs. *BMC Pharmacol* 6:6.
- Han J, Li Y, Wang D, Wei C, Yang X, Sui N (2010) Effect of 5-aza-2-deoxycytidine microinjecting into hippocampus and prelimbic cortex on acquisition and retrieval of cocaine-induced place preference in C57BL/6 mice. *Eur J Pharmacol* 642:93–98.
- Hansen RS, Wijmenga C, Luo P, Stanek AM, Canfield TK, Weemaes CMR, Gartler SM (1999) The DNMT3B DNA methyltransferase gene is mutated in the ICF immunodeficiency syndrome. *Proc Natl Acad Sci* 96:14412–14417.
- Harrison Narcotic Tax Act (1914).
- Hata K, Okano M, Lei H, Li E (2002) Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Dev Camb Engl* 129:1983–1993.
- Haute Autorité de Santé (2010) Prise en charge des consommateurs de cocaïne - Argumentaire, Rapport de février 2010.
- Hawk JD, Florian C, Abel T (2011) Post-training intrahippocampal inhibition of class I histone deacetylases enhances long-term object-location memory. *Learn Mem Cold Spring Harb N* 18:367–370.
- Hellman A, Chess A (2007) Gene body-specific methylation on the active X chromosome. *Science* 315:1141–1143.
- Herbert A, Alfken J, Kim YG, Mian IS, Nishikura K, Rich A (1997) A Z-DNA binding domain present in the human editing enzyme, double-stranded RNA adenosine deaminase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:8421–8426.
- Hermann A, Schmitt S, Jeltsch A (2003) The human Dnmt2 has residual DNA-(cytosine-C5) methyltransferase activity. *J Biol Chem* 278:31717–31721.

H

Haber SN (2003) The primate basal ganglia: parallel and integrative networks. *J Chem Neuroanat* 26:317–330.

- He Y-F, Li B-Z, Li Z, Liu P, Wang Y, Tang Q, Ding J, Jia Y, Chen Z, Li L, Sun Y, Li X, Dai Q, Song C-X, Zhang K, He C, Xu G-L (2011) Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science* 333:1303–1307.
- Hill SY, Mendelson WB, Bernstein DA (1977) Cocaine effects on sleep parameters in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 51:125–127.
- Hodos W (1961) Progressive ratio as a measure of reward strength. *Science* 134:943–944.
- Holliday R (1987) The inheritance of epigenetic defects. *Science* 238:163–170.
- Holliday R, Pugh JE (1975) DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* 187:226–232.
- Homberg JR, De Boer SF, Raasø HS, Olivier JDA, Verheul M, Ronken E, Cools AR, Ellenbroek BA, Schoffemeer ANM, Vanderschuren LJM, De Vries TJ, Cuppen E (2008) Adaptations in pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptor function and cocaine supersensitivity in serotonin transporter knockout rats. *Psychopharmacology (Berl)* 200:367–380.
- Hong EJ, West AE, Greenberg ME (2005) Transcriptional control of cognitive development. *Curr Opin Neurobiol* 15:21–28.
- Horne MK, Lee J, Chen F, Lanning K, Tomas D, Lawrence AJ (2008) Long-term administration of cocaine or serotonin reuptake inhibitors results in anatomical and neurochemical changes in noradrenergic, dopaminergic, and serotonin pathways. *J Neurochem* 106:1731–1744.
- 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.
- 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 Oxf Engl* 25:222–229.
- Howlett SK, Reik W (1991) Methylation levels of maternal and paternal genomes during preimplantation development. *Development* 113:119–127.
- Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PP (1994) International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev* 46:157–203.
- Hoyer D, Hannon JP, Martin GR (2002) Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 71:533–554.
- Huang H, Lee SH, Ye C, Lima IS, Oh B-C, Lowell BB, Zabolotny JM, Kim Y-B (2013) ROCK1 in AgRP neurons regulates energy expenditure and locomotor activity in male mice. *Endocrinology* 154:3660–3670.
- Huh I, Zeng J, Park T, Yi SV (2013) DNA methylation and transcriptional noise. *Epigenetics Chromatin* 6:9.
- 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.
- Hurd PJ, Whitmarsh AJ, Baldwin GS, Kelly SM, Waltho JP, Price NC, Connolly BA, Hornby DP (1999) Mechanism-based inhibition of C5-cytosine DNA methyltransferases by 2-H pyrimidinone. *J Mol Biol* 286:389–401.
- 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

- Illingworth RS, Gruenewald-Schneider U, Webb S, Kerr ARW, James KD, Turner DJ, Smith C, Harrison DJ, Andrews R, Bird AP (2010) Orphan CpG Islands Identify Numerous Conserved Promoters in the Mammalian Genome. *PLoS Genet* 6:e1001134.

- Im H-I, Hollander JA, Bali P, Kenny PJ (2010) MeCP2 controls BDNF expression and cocaine intake through homeostatic interactions with microRNA-212. *Nat Neurosci* 13:1120–1127.
- Inaba T (1989) Cocaine: pharmacokinetics and biotransformation in man. *Can J Physiol Pharmacol* 67:1154–1157.
- Ito S, Shen L, Dai Q, Wu SC, Collins LB, Swenberg JA, He C, Zhang Y (2011) Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science* 333:1300–1303.
- Ito Y, Nativio R, Murrell A (2013) Induced DNA demethylation can reshape chromatin topology at the IGF2-H19 locus. *Nucleic Acids Res* 41:5290–5302.
- Iwamoto K, Bundo M, Ueda J, Oldham MC, Ukai W, Hashimoto E, Saito T, Geschwind DH, Kato T (2011) Neurons show distinctive DNA methylation profile and higher interindividual variations compared with non-neurons. *Genome Res* 21:688–696.
- J**
- Jablonka E, Lamb MJ (1989) The inheritance of acquired epigenetic variations. *J Theor Biol* 139:69–83.
- Jackson ME, Frost AS, Moghaddam B (2001) Stimulation of prefrontal cortex at physiologically relevant frequencies inhibits dopamine release in the nucleus accumbens. *J Neurochem* 78:920–923.
- Jacobs BL, Azmitia EC (1992) Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev* 72:165–229.
- Jaenisch R, Bird A (2003) Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 33 Suppl:245–254.
- Jatlow P, Elsworth JD, Bradberry CW, Winger G, Taylor JR, Russell R, Roth RH (1991) Cocaethylene: a neuropharmacologically active metabolite associated with concurrent cocaine-ethanol ingestion. *Life Sci* 48:1787–1794.
- Javaid JI, Fischman MW, Schuster CR, Dekirmenjian H, Davis JM (1978) Cocaine plasma concentration: relation to physiological and subjective effects in humans. *Science* 202:227–228.
- Javaid JI, Musa MN, Fischman M, Schuster CR, Davis JM (1983) Kinetics of cocaine in humans after intravenous and intranasal administration. *Biopharm Drug Dispos* 4:9–18.
- Jaworski J (2007) ARF6 in the nervous system. *Eur J Cell Biol* 86:513–524.
- Jeffcoat AR, Perez-Reyes M, Hill JM, Sadler BM, Cook CE (1989) Cocaine disposition in humans after intravenous injection, nasal insufflation (snorting), or smoking. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem* 17:153–159.
- Jimenez-Useche I, Shim D, Yu J, Yuan C (2014) Unmethylated and methylated CpG dinucleotides distinctively regulate the physical properties of DNA. *Biopolymers* 101:517–524.
- Jin B, Tao Q, Peng J, Soo HM, Wu W, Ying J, Fields CR, Delmas AL, Liu X, Qiu J, Robertson KD (2008) DNA methyltransferase 3B (DNMT3B) mutations in ICF syndrome lead to altered epigenetic modifications and aberrant expression of genes regulating development, neurogenesis and immune function. *Hum Mol Genet* 17:690–709.
- Jin S-G, Wu X, Li AX, Pfeifer GP (2011) Genomic mapping of 5-hydroxymethylcytosine in the human brain. *Nucleic Acids Res* 39:5015–5024.
- Jjingo D, Conley AB, Yi SV, Lunyak VV, Jordan IK (2012) On the presence and role of human gene-body DNA methylation. *Oncotarget* 3:462–474.
- Johanson CE, Fischman MW (1989) The pharmacology of cocaine related to its abuse. *Pharmacol Rev* 41:3–52.
- Jones PA (1999) The DNA methylation paradox. *Trends Genet TIG* 15:34–37.
- 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.

- Jost JP (1993) Nuclear extracts of chicken embryos promote an active demethylation of DNA by excision repair of 5-methyldeoxycytidine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:4684–4688.
- Jost JP, Jost YC (1995) Mechanism of active DNA demethylation during embryonic development and cellular differentiation in vertebrates. *Gene* 157:265–266.
- Jost JP, Siegmann M, Sun L, Leung R (1995) Mechanisms of DNA demethylation in chicken embryos. Purification and properties of a 5-methylcytosine-DNA glycosylase. *J Biol Chem* 270:9734–9739.
- Juttermann R, Li E, Jaenisch R (1994) Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:11797–11801.
- # K
- Kafri T, Ariel M, Brandeis M, Shemer R, Urven L, McCarrey J, Cedar H, Razin A (1992) Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line. *Genes Dev* 6:705–714.
- 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.
- Kaneda M, Okano M, Hata K, Sado T, Tsujimoto N, Li E, Sasaki H (2004) Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature* 429:900–903.
- Kangaspeska S, Stride B, Métivier R, Polycarpou-Schwarz M, Ibberson D, Carmouche RP, Benes V, Gannon F, Reid G (2008) Transient cyclical methylation of promoter DNA. *Nature* 452:112–115.
- Karahoca M, Momparler RL (2013) Pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in the design of its dose-schedule for cancer therapy. *Clin Epigenetics* 5:3.
- Kato T, Iwamoto K (2014) Comprehensive DNA methylation and hydroxymethylation analysis in the human brain and its implication in mental disorders. *Neuropharmacology* 80:133–139.
- Kauer JA, Malenka RC (2007) Synaptic plasticity and addiction. *Nat Rev Neurosci* 8:844–858.
- Kebabian JW, Beaulieu M, Itoh Y (1984) Pharmacological and biochemical evidence for the existence of two categories of dopamine receptor. *Can J Neurol Sci J Can Sci Neurol* 11:114–117.
- Kennedy PJ, Feng J, Robison AJ, Maze I, Badimon A, Mouzon E, Chaudhury D, Damez-Werno DM, Haggarty SJ, Han M-H, Bassel-Duby R, Olson EN, Nestler EJ (2013) Class I HDAC inhibition blocks cocaine-induced plasticity by targeted changes in histone methylation. *Nat Neurosci* 16:434–440.
- Khare T *et al.* (2012) 5-hmC in the brain is abundant in synaptic genes and shows differences at the exon-intron boundary. *Nat Struct Mol Biol* 19:1037–1043.
- Kilgore M, Miller CA, Fass DM, Hennig KM, Haggarty SJ, Sweatt JD, Rumbaugh G (2010) Inhibitors of class 1 histone deacetylases reverse contextual memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol* 35:870–880.
- Kilstrup-Nielsen C, Rusconi L, La Montanara P, Ciceri D, Bergo A, Bedogni F, Landsberger N (2012) What we know and would like to know about CDKL5 and its involvement in epileptic encephalopathy. *Neural Plast* 2012:728267.
- Kim CH, Marquez VE, Mao DT, Haines DR, McCormack JJ (1986) Synthesis of pyrimidin-2-one nucleosides as acid-stable inhibitors of cytidine deaminase. *J Med Chem* 29:1374–1380.
- Kim G-D, Ni J, Kelesoglu N, Roberts RJ, Pradhan S (2002) Co-operation and communication between the human maintenance and de novo DNA (cytosine-5) methyltransferases. *EMBO J* 21:4183–4195.
- Kiritsy-Roy JA, Halter JB, Gordon SM, Smith MJ, Terry LC (1990) Role of the central nervous system in hemodynamic and sympathoadrenal responses to cocaine in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 255:154–160.

- Klose RJ, Sarraf SA, Schmiedeberg L, McDermott SM, Stancheva I, Bird AP (2005) DNA Binding Selectivity of MeCP2 Due to a Requirement for A/T Sequences Adjacent to Methyl-CpG. *Mol Cell* 19:667–678.
- Koe BK (1976) Molecular geometry of inhibitors of the uptake of catecholamines and serotonin in synaptosomal preparations of rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 199:649–661.
- Kohli RM, Zhang Y (2013) TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature* 502:472–479.
- Kohtz AS, Paris JJ, Frye CA (2010) Low doses of cocaine decrease, and high doses increase, anxiety-like behavior and brain progesterone levels among intact rats. *Horm Behav* 57:474–480.
- Koob GF, Bloom FE (1988) Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. *Science* 242:715–723.
- Koob GF, Le Moal ML (1997) Drug Abuse: Hedonic Homeostatic Dysregulation. *Science* 278:52–58.
- Koob GF, Le Moal M (2005) Plasticity of reward neurocircuitry and the “dark side” of drug addiction. *Nat Neurosci* 8:1442–1444.
- Koob G, Hicks MJ, Wee S, Rosenberg JB, De BP, Kaminsky SM, Moreno A, Janda KD, Crystal RG (2011) Anti-cocaine vaccine based on coupling a cocaine analog to a disrupted adenovirus. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 10:899–904.
- Körber C, Richter A, Kaiser M, Schlicksupp A, Mükusch S, Kuner T, Kirsch J, Kuhse J (2012) Effects of distinct collybistin isoforms on the formation of GABAergic synapses in hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci* 50:250–259.
- Kornblihtt AR (2007) Coupling transcription and alternative splicing. *Adv Exp Med Biol* 623:175–189.
- Kozarewa I, Ning Z, Quail MA, Sanders MJ, Berriman M, Turner DJ (2009) Amplification-free Illumina sequencing-library preparation facilitates improved mapping and assembly of (G+C)-biased genomes. *Nat Methods* 6:291–295.
- Kozlenkov A, Roussos P, Timashpolsky A, Barbu M, Rudchenko S, Bibikova M, Klotzle B, Byne W, Lyddon R, Di Narzo AF, Hurd YL, Koonin EV, Dracheva S (2014) Differences in DNA methylation between human neuronal and glial cells are concentrated in enhancers and non-CpG sites. *Nucleic Acids Res* 42:109–127.
- Kreis P, Thévenot E, Rousseau V, Boda B, Muller D, Barnier J-V (2007) The p21-activated kinase 3 implicated in mental retardation regulates spine morphogenesis through a Cdc42-dependent pathway. *J Biol Chem* 282:21497–21506.
- Kriaucionis S, Heintz N (2009) The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science* 324:929–930.
- Kristensen AS, Andersen J, Jørgensen TN, Sørensen L, Eriksen J, Loland CJ, Strømgaard K, Gether U (2011) SLC6 Neurotransmitter Transporters: Structure, Function, and Regulation. *Pharmacol Rev* 63:585–640.
- Kuhar MJ, Ritz MC, Boja JW (1991) The dopamine hypothesis of the reinforcing properties of cocaine. *Trends Neurosci* 14:299–302.
- Kuhlmann M, Borisova BE, Kaller M, Larsson P, Stach D, Na J, Eichinger L, Lyko F, Ambros V, Söderbom F, Hammann C, Nellen W (2005) Silencing of retrotransposons in *Dictyostelium* by DNA methylation and RNAi. *Nucleic Acids Res* 33:6405–6417.
- Kundakovic M, Chen Y, Costa E, Grayson DR (2007) DNA methyltransferase inhibitors coordinately induce expression of the human reelin and glutamic acid decarboxylase 67 genes. *Mol Pharmacol* 71:644–653.
- Kundakovic M, Chen Y, Guidotti A, Grayson DR (2009) The reelin and GAD67 promoters are activated by epigenetic drugs that facilitate the disruption of local repressor complexes. *Mol Pharmacol* 75:342–354.

L

- Lamparska K, Clark J, Babilonia G, Bedell V, Yip W, Smith SS (2012) 2'-Deoxyriboguanylurea, the primary breakdown product of 5-aza-2'-deoxyribocytidine, is a mutagen, an epimutagen, an inhibitor of DNA methyltransferases and an inducer of 5-azacytidine-type fragile sites. *Nucleic Acids Res* 40:9788–9801.
- Lander ES *et al.* (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860–921.
- Lane AA, Chabner BA (2009) Histone Deacetylase Inhibitors in Cancer Therapy. *J Clin Oncol* 27:5459–5468.
- LaPlant Q *et al.* (2010) Dnmt3a regulates emotional behavior and spine plasticity in the nucleus accumbens. *Nat Neurosci* 13:1137–1143.
- Lau CE, Ma F, Foster DM, Falk JL (1999) Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the psychomotor stimulant effect of cocaine after intravenous administration: timing performance deficits. *J Pharmacol Exp Ther* 288:535–543.
- Laurent L, Wong E, Li G, Huynh T, Tsirigos A, Ong CT, Low HM, Kin Sung KW, Rigoutsos I, Loring J, Wei C-L (2010) Dynamic changes in the human methylome during differentiation. *Genome Res* 20:320–331.
- Lazarovici A, Zhou T, Shafer A, Dantas Machado AC, Riley TR, Sandstrom R, Sabo PJ, Lu Y, Rohs R, Stamatoyannopoulos JA, Bussemaker HJ (2013) Probing DNA shape and methylation state on a genomic scale with DNase I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:6376–6381.
- Lee JY, Lee T-H (2012) Effects of histone acetylation and CpG methylation on the structure of nucleosomes. *Biochim Biophys Acta* 1824:974–982.
- 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, Roth TL, Lubin FD, Miller CA, Huang I-C, Desai P, Malone LM, Sweatt JD (2006) Evidence that DNA (cytosine-5) methyltransferase regulates synaptic plasticity in the hippocampus. *J Biol Chem* 281:15763–15773.
- 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.
- Ley TJ *et al.* (2010) DNMT3A Mutations in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 363:2424–2433.
- Liang G, Chan MF, Tomigahara Y, Tsai YC, Gonzales FA, Li E, Laird PW, Jones PA (2002) Cooperativity between DNA Methyltransferases in the Maintenance Methylation of Repetitive Elements. *Mol Cell Biol* 22:480–491.
- Li E, Beard C, Jaenisch R (1993) Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* 366:362–365.
- Li E, Bestor TH, Jaenisch R (1992) Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69:915–926.
- Lim HW, Iwatani M, Hattori N, Tanaka S, Yagi S, Shiota K (2010) Resistance to 5-aza-2'-deoxycytidine in genic regions compared to non-genic repetitive sequences. *J Reprod Dev* 56:86–93.
- Lindvall O, Björklund A (1974) The organization of the ascending catecholamine neuron systems in the rat brain as revealed by the glyoxylic acid fluorescence method. *Acta Physiol Scand Suppl* 412:1–48.
- Lister R *et al.* (2013) Global epigenomic reconfiguration during mammalian brain development. *Science* 341:1237905.
- Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, Nery JR, Lee L, Ye Z, Ngo Q-M, Edsall L, Antosiewicz-Bourget J, Stewart R, Ruotti V, Millar AH, Thomson JA, Ren B, Ecker JR (2009) Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 462:315–322.

- Liu DZ, Sharp FR, Van KC, Ander BP, Ghiasvand R, Zhan X, Stamova B, Jickling GC, Lyeth BG (2014) Inhibition of Src Family Kinases Protects Hippocampal Neurons and Improves Cognitive Function after Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma*.
- Liutkevičiūtė Z, Lukinavičius G, Masevičius V, Daujotytė D, Klimašauskas S (2009) Cytosine-5-methyltransferases add aldehydes to DNA. *Nat Chem Biol* 5:400–402.
- Li W, Liu M (2011) Distribution of 5-hydroxymethylcytosine in different human tissues. *J Nucleic Acids* 2011:870726.
- Li X, Baker-Andresen D, Zhao Q, Marshall V, Bredy TW (2014) Methyl CpG Binding Domain Ultra-Sequencing: a novel method for identifying inter-individual and cell-type-specific variation in DNA methylation. *Genes Brain Behav*.
- Lorincz MC, Dickerson DR, Schmitt M, Groudine M (2004) Intragenic DNA methylation alters chromatin structure and elongation efficiency in mammalian cells. *Nat Struct Mol Biol* 11:1068–1075.
- 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.
- Malvaez M, Mhillaj E, Matheos DP, Palmery M, Wood MA (2011) CBP in the nucleus accumbens regulates cocaine-induced histone acetylation and is critical for cocaine-associated behaviors. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 31:16941–16948.
- Manzardo AM, Henkhaus RS, Butler MG (2012) Global DNA promoter methylation in frontal cortex of alcoholics and controls. *Gene* 498:5–12.
- Marmorstein R, Trievel RC (2009) Histone modifying enzymes: Structures, mechanisms, and specificities. *Biochim Biophys Acta BBA - Gene Regul Mech* 1789:58–68.
- Martin BJ, Naughton BJ, Thirtamara-Rajamani K, Yoon DJ, Han DD, Devries AC, Gu HH (2011) Dopamine transporter inhibition is necessary for cocaine-induced increases in dendritic spine density in the nucleus accumbens. *Synapse* 65:490–496.
- Martínez JG, Pérez-Escuredo J, Castro-Santos P, Marcos CA, Pendás JLL, Fraga MF, Hermsen MA (2012) Hypomethylation of LINE-1, and not centromeric SAT- α , is associated with centromeric instability in head and neck squamous cell carcinoma. *Cell Oncol Dordr* 35:259–267.
- Martinowich K, Hattori D, Wu H, Fouse S, He F, Hu Y, Fan G, Sun YE (2003) DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation. *Science* 302:890–893.
- Massart R, Suderman M, Provencal N, Yi C, Bennett AJ, Suomi S, Szyf M (2014) Hydroxymethylation and DNA methylation profiles in the prefrontal cortex of the non-human primate rhesus macaque and the impact of maternal deprivation on hydroxymethylation. *Neuroscience* 268:139–148.
- Mattay VS, Goldberg TE, Fera F, Hariri AR, Tessitore A, Egan MF, Kolachana B, Callicott JH, Weinberger DR (2003) Catechol O-methyltransferase val158-met genotype and individual variation in the brain response to amphetamine. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:6186–6191.
- Maunakea AK *et al.* (2010) Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters. *Nature* 466:253–257.

M

- Maddox SA, Schafe GE (2011) Epigenetic alterations in the lateral amygdala are required for reconsolidation of a Pavlovian fear memory. *Learn Mem Cold Spring Harb N* 18:579–593.
- Ma DK, Jang M-H, Guo JU, Kitabatake Y, Chang M-L, Pow-Anpongkul N, Flavell RA, Lu B, Ming G-L, Song H (2009) Neuronal activity-induced Gadd45b promotes epigenetic DNA demethylation and adult neurogenesis. *Science* 323:1074–1077.
- Malvaez M, McQuown SC, Rogge GA, Astarabadi M, Jacques V, Carreiro S, Rusche JR, Wood MA (2013) HDAC3-selective inhibitor enhances extinction of cocaine-seeking behavior in a persistent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:2647–2652.

- McCance EF, Price LH, Kosten TR, Jatlow PI (1995) Cocaethylene: pharmacology, physiology and behavioral effects in humans. *J Pharmacol Exp Ther* 274:215–223.
- McClung CA, Sidiropoulou K, Vitaterna M, Takahashi JS, White FJ, Cooper DC, Nestler EJ (2005) Regulation of dopaminergic transmission and cocaine reward by the Clock gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:9377–9381.
- Mellén M, Ayata P, Dewell S, Kriaucionis S, Heintz N (2012) MeCP2 Binds to 5hmC Enriched within Active Genes and Accessible Chromatin in the Nervous System. *Cell* 151:1417–1430.
- Mendelson JH, Mello NK (1996) Management of cocaine abuse and dependence. *N Engl J Med* 334:965–972.
- Mendelson JH, Mello NK, Teoh SK, Ellingboe J, Cochin J (1989) Cocaine effects on pulsatile secretion of anterior pituitary, gonadal, and adrenal hormones. *J Clin Endocrinol Metab* 69:1256–1260.
- Meng C-F, Su B, Li W (2011) DNA demethylation is superior to histone acetylation for reactivating cancer-associated genes in ovarian cancer cells. *Mol Med Rep* 4:1273–1278.
- Métivier R, Gallais R, Tiffoche C, Le Péron C, Jurkowska RZ, Carmouche RP, Ibberson D, Barath P, Demay F, Reid G, Benes V, Jeltsch A, Gannon F, Salbert G (2008) Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter. *Nature* 452:45–50.
- Meyer-Lindenberg A, Miletich RS, Kohn PD, Esposito G, Carson RE, Quarantelli M, Weinberger DR, Berman KF (2002) Reduced prefrontal activity predicts exaggerated striatal dopaminergic function in schizophrenia. *Nat Neurosci* 5:267–271.
- Mierzejewski P, Koroś E, Goldberg SR, Kostowski W, Stefański R (2003) Intravenous self-administration of morphine and cocaine: a comparative study. *Pol J Pharmacol* 55:713–726.
- Miller CA, Campbell SL, Sweatt JD (2008) DNA methylation and histone acetylation work in concert to regulate memory formation and synaptic plasticity. *Neurobiol Learn Mem* 89:599–603.
- Miller CA, Gavin CF, White JA, Parrish RR, Honasoge A, Yancey CR, Rivera IM, Rubio MD, Rumbaugh G, Sweatt JD (2010) Cortical DNA methylation maintains remote memory. *Nat Neurosci* 13:664–666.
- Miller CA, Sweatt JD (2007) Covalent modification of DNA regulates memory formation. *Neuron* 53:857–869.
- Mitchell CP, Chen Y, Kundakovic M, Costa E, Grayson DR (2005) Histone deacetylase inhibitors decrease reelin promoter methylation in vitro. *J Neurochem* 93:483–492.
- Money KM, Stanwood GD (2013) Developmental origins of brain disorders: roles for dopamine. *Front Cell Neurosci* 7:260.
- Monk M, Boubelik M, Lehnert S (1987) Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development. *Dev Camb Engl* 99:371–382.
- Monsey MS, Ota KT, Akingbade IF, Hong ES, Schafe GE (2011) Epigenetic alterations are critical for fear memory consolidation and synaptic plasticity in the lateral amygdala. *PloS One* 6:e19958.
- Montoya ID (2012) Advances in the development of biologics to treat drug addictions and overdose. *Adicciones* 24:95–103.
- Morgan HD, Dean W, Coker HA, Reik W, Petersen-Mahrt SK (2004) Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming. *J Biol Chem* 279:52353–52360.
- Morris MJ, Mahgoub M, Na ES, Pranav H, Monteggia LM (2013) Loss of histone deacetylase 2 improves working memory and accelerates extinction learning. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 33:6401–6411.
- Mueller-Planitz F, Klinker H, Becker PB (2013) Nucleosome sliding mechanisms: new twists in a looped history. *Nat Struct Mol Biol* 20:1026–1032.
- Muschler MAN, Hillemacher T, Kraus C, Kornhuber J, Bleich S, Frieling H (2010) DNA methylation of the POMC gene promoter is associated with craving in alcohol dependence. *J Neural Transm Vienna Austria* 117:513–519.

Muto M, Kanari Y, Kubo E, Takabe T, Kurihara T, Fujimori A, Tatsumi K (2002) Targeted Disruption of Np95 Gene Renders Murine Embryonic Stem Cells Hypersensitive to DNA Damaging Agents and DNA Replication Blocks. *J Biol Chem* 277:34549–34555.

Mychasiuk R, Muhammad A, Ilnytsky S, Kolb B (2013) Persistent gene expression changes in NAc, mPFC, and OFC associated with previous nicotine or amphetamine exposure. *Behav Brain Res* 256:655–661.

N

Nabel CS, Jia H, Ye Y, Shen L, Goldschmidt HL, Stivers JT, Zhang Y, Kohli RM (2012) AID/APOBEC deaminases disfavor modified cytosines implicated in DNA demethylation. *Nat Chem Biol* 8:751–758.

Nair SS, Coolen MW, Stirzaker C, Song JZ, Statham AL, Strbenac D, Robinson MD, Clark SJ (2011) Comparison of methyl-DNA immunoprecipitation (MeDIP) and methyl-CpG binding domain (MBD) protein capture for genome-wide DNA methylation analysis reveal CpG sequence coverage bias. *Epigenetics* 6:34–44.

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, Meehan RR, Bird A (1993) Dissection of the methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein MeCP2. *Nucleic Acids Res* 21:4886–4892.

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.

Nathanson JA, Hunnicutt EJ, Kantham L, Scavone C (1993) Cocaine as a naturally occurring insecticide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:9645–9648.

Nayak PK, Misra AL, Mulé SJ (1976) Physiological disposition and biotransformation of (3H) cocaine in acutely and chronically treated rats. *J Pharmacol Exp Ther* 196:556–569.

Nelson ED, Kavalali ET, Monteggia LM (2008) Activity-dependent suppression of miniature neurotransmission through the regulation of DNA methylation. *J Neurosci* 28:395–406.

Ng HH, Zhang Y, Hendrich B, Johnson CA, Turner BM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D, Bird A (1999) MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat Genet* 23:58–61.

N HK, Chow MZ, Baker EK, Pal S, Bassal S, Brasacchio D, Wang L, Craig JM, Jones PL, Sif S, El-Osta A (2005) Brahma links the SWI/SNF chromatin-remodeling complex with MeCP2-dependent transcriptional silencing. *Nat Genet* 37:254–264.

Nichols DE, Nichols CD (2008) Serotonin receptors. *Chem Rev* 108:1614–1641.

Nielsen DA, Huang W, Hamon SC, Maili L, Witkin BM, Fox RG, Cunningham KA, Moeller FG (2012) Forced Abstinence from Cocaine Self-Administration is Associated with DNA Methylation Changes in Myelin Genes in the Corpus Callosum: a Preliminary Study. *Front Psychiatry* 3:60.

Nonkes LJP, van Bussel IPG, Verheij MMM, Homberg JR (2011) The interplay between brain 5-hydroxytryptamine levels and cocaine addiction. *Behav Pharmacol* 22:723–738.

O

Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E (1999) DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development. *Cell* 99:247–257.

Okano M, Xie S, Li E (1998a) Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 26:2536–2540.

- Okano M, Xie S, Li E (1998b) Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet* 19:219–220.
- Oku Y, Haganir RL (2013) AGAP3 and Arf6 regulate trafficking of AMPA receptors and synaptic plasticity. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 33:12586–12598.
- 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.
- Oleson EB, Richardson JM, Roberts DCS (2011) A novel IV cocaine self-administration procedure in rats: differential effects of dopamine, serotonin, and GABA drug pre-treatments on cocaine consumption and maximal price paid. *Psychopharmacology (Berl)* 214:567–577.
- Oster B, Thorsen K, Lamy P, Wojdacz TK, Hansen LL, Birkenkamp-Demtröder K, Sørensen KD, Laurberg S, Orntoft TF, Andersen CL (2011) Identification and validation of highly frequent CpG island hypermethylation in colorectal adenomas and carcinomas. *Int J Cancer J Int Cancer* 129:2855–2866.
- Ozburn AR, Larson EB, Self DW, McClung CA (2012) Cocaine self-administration behaviors in Clock Δ 19 mice. *Psychopharmacology (Berl)* 223:169–177.
- P**
- Parsons LH, Justice JB Jr (1993) Serotonin and dopamine sensitization in the nucleus accumbens, ventral tegmental area, and dorsal raphe nucleus following repeated cocaine administration. *J Neurochem* 61:1611–1619.
- Pascual-Leone A, Dhuna A, Anderson DC (1991) Cerebral atrophy in habitual cocaine abusers: a planimetric CT study. *Neurology* 41:34–38.
- Patra SK, Bettuzzi S (2009) Epigenetic DNA-(cytosine-5-carbon) modifications: 5-aza-2'-deoxycytidine and DNA-demethylation. *Biochem Biokhimiia* 74:613–619.
- Patrizi A, Viltono L, Frola E, Harvey K, Harvey RJ, Sassoè-Pognetto M (2012) Selective localization of collybistin at a subset of inhibitory synapses in brain circuits. *J Comp Neurol* 520:130–141.
- Paxinos G, Watson C (2007) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: Hard Cover Edition*. Academic Press.
- Pedrali-Noy G, Weissbach A (1986) Mammalian DNA methyltransferases prefer poly(dI-dC) as substrate. *J Biol Chem* 261:7600–7602.
- Pennings S, Allan J, Davey CS (2005) DNA methylation, nucleosome formation and positioning. *Brief Funct Genomic Proteomic* 3:351–361.
- Penn NW, Suwalski R, O'Riley C, Bojanowski K, Yura R (1972) The presence of 5-hydroxymethylcytosine in animal deoxyribonucleic acid. *Biochem J* 126:781–790.
- Perper JA, Van Thiel DH (1992) Respiratory complications of cocaine abuse. *Recent Dev Alcohol Off Publ Am Med Soc Alcohol Res Soc Alcohol Natl Council Alcohol* 10:363–377.
- Phalke S, Nickel O, Walluscheck D, Hortig F, Onorati MC, Reuter G (2009) Retrotransposon silencing and telomere integrity in somatic cells of *Drosophila* depends on the cytosine-5 methyltransferase DNMT2. *Nat Genet* 41:696–702.
- Pickens CL, Airavaara M, Theberge F, Fanous S, Hope BT, Shaham Y (2011) Neurobiology of the incubation of drug craving. *Trends Neurosci* 34:411–420.
- Pickens R, Thompson T (1968) Cocaine-reinforced behavior in rats: effects of reinforcement magnitude and fixed-ratio size. *J Pharmacol Exp Ther* 161:122–129.
- Pilcher JE (1886) II. Cocaine as an Anaesthetic; Its Status at the Close of the First Year of its Use. *Ann Surg* 3:51–66.
- Pliml J, Sorm F (1964) Synthesis of 2'-deoxy-D-ribofuranosyl-5-azacytosine. *Coll Czech Chem Commun* 29:2576–2577.

Pol Bodetto S, Carouge D, Fonteneau M, Dietrich J-B, Zwiller J, Anglard P (2013) Cocaine represses protein phosphatase-1C β through DNA methylation and Methyl-CpG Binding Protein-2 recruitment in adult rat brain. *Neuropharmacology* 73:31–40.

Pol Bodetto S, Romieu P, Sartori M, Tesone-Coelho C, Majchrzak M, Barbelivien A, Zwiller J, Anglard P (2014) Differential regulation of MeCP2 and PP1 in passive or voluntary administration of cocaine or food. *Int J Neuropsychopharmacol Off Sci J Coll Int Neuropsychopharmacol CINP*:1–14.

Ponomarev I, Wang S, Zhang L, Harris RA, Mayfield RD (2012) Gene Coexpression Networks in Human Brain Identify Epigenetic Modifications in Alcohol Dependence. *J Neurosci* 32:1884–1897.

Popp C, Dean W, Feng S, Cokus SJ, Andrews S, Pellegrini M, Jacobsen SE, Reik W (2010) Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency. *Nature* 463:1101–1105.

Poptsova MS, Il'icheva IA, Nechipurenko DY, Panchenko LA, Khodikov MV, Oparina NY, Polozov RV, Nechipurenko YD, Grokhovsky SL (2014) Non-random DNA fragmentation in next-generation sequencing. *Sci Rep* 4:4532.

Portella G, Battistini F, Orozco M (2013) Understanding the connection between epigenetic DNA methylation and nucleosome positioning from computer simulations. *PLoS Comput Biol* 9:e1003354.

Post RM (1975) Cocaine psychoses: a continuum model. *Am J Psychiatry* 132:225–231.

Post RM, Weiss SR, Fontana D, Pert A (1992) Conditioned sensitization to the psychomotor stimulant cocaine. *Ann N Y Acad Sci* 654:386–399.

Q

R

Rao F, Cha J, Xu J, Xu R, Vandiver MS, Tyagi R, Tokhunts R, Koldobskiy MA, Fu C, Barrow R, Wu M, Fiedler D, Barrow JC, Snyder SH (2014) Inositol pyrophosphates mediate the DNA-PK/ATM-p53 cell death pathway by regulating CK2 phosphorylation of Tti1/Tel2. *Mol Cell* 54:119–132.

Rauch TA, Wu X, Zhong X, Riggs AD, Pfeifer GP (2009) A human B cell methylome at 100-base pair resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:671–678.

Reith ME (1986) Effect of repeated administration of various doses of cocaine and WIN 35,065-2 on locomotor behavior of mice. *Eur J Pharmacol* 130:65–72.

Rhee I, Bachman KE, Park BH, Jair K-W, Yen R-WC, Schuebel KE, Cui H, Feinberg AP, Lengauer C, Kinzler KW, Baylin SB, Vogelstein B (2002) DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature* 416:552–556.

Rhee I, Jair KW, Yen RW, Lengauer C, Herman JG, Kinzler KW, Vogelstein B, Baylin SB, Schuebel KE (2000) CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1. *Nature* 404:1003–1007.

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

Riggs AD (1975) X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet Cell Genet* 14:9–25.

Ritz MC, Kuhar MJ (1993) Psychostimulant drugs and a dopamine hypothesis regarding addiction: update on recent research. *Biochem Soc Symp* 59:51–64.

Ritz MC, Lamb RJ, Goldberg SR, Kuhar MJ (1987) Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine. *Science* 237:1219–1223.

- Rivard GE, Momparler RL, Demers J, Benoit P, Raymond R, Lin K, Momparler LF (1981) Phase I study on 5-aza-2'-deoxycytidine in children with acute leukemia. *Leuk Res* 5:453–462.
- Robbins TW, Everitt BJ (1999) Drug addiction: bad habits add up. *Nature* 398:567–570.
- Robertson KD (2005) DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet* 6:597–610.
- Robinson TE, Berridge KC (2000) The psychology and neurobiology of addiction: an incentive-sensitization view. *Addict Abingdon Engl* 95 Suppl 2:S91–117.
- Robinson TE, Berridge KC (2008) The incentive sensitization theory of addiction: some current issues. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 363:3137–3146.
- 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. *Synap N Y N* 39:257–266.
- Robinson TE, Kolb B (1999) Alterations in the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and prefrontal cortex following repeated treatment with amphetamine or cocaine. *Eur J Neurosci* 11:1598–1604.
- Robinson TE, Kolb B (2004) Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. *Neuropharmacology* 47 Suppl 1:33–46.
- Rogério R, Takahashi RN (1992) Anxiogenic properties of cocaine in the rat evaluated with the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 43:631–633.
- 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.
- Romieu P, Host L, Gobaille S, Sandner G, Aunis D, Zwiller J (2008) Histone deacetylase inhibitors decrease cocaine but not sucrose self-administration in rats. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 28:9342–9348.
- Rothman RB, Baumann MH (2003) Monoamine transporters and psychostimulant drugs. *Eur J Pharmacol* 479:23–40.
- Sales AJ, Biojone C, Terceti MS, Guimarães FS, Gomes MV, Joca SR (2011) Antidepressant-like effect induced by systemic and intra-hippocampal administration of DNA methylation inhibitors. *Br J Pharmacol* 164:1711–1721.
- Sanchis-Segura C, Spanagel R (2006) Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. *Addict Biol* 11:2–38.
- Sarmah B, Wenthe SR (2010) Inositol hexakisphosphate kinase-2 acts as an effector of the vertebrate Hedgehog pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:19921–19926.
- Sarnyai Z, Bíró E, Gardi J, Vecsernyés M, Julesz J, Telegdy G (1995) Brain corticotropin-releasing factor mediates “anxiety-like” behavior induced by cocaine withdrawal in rats. *Brain Res* 675:89–97.
- Sati S, Tanwar VS, Kumar KA, Patowary A, Jain V, Ghosh S, Ahmad S, Singh M, Reddy SU, Chandak GR, Raghunath M, Sivasubbu S, Chakraborty K, Scaria V, Sengupta S (2012) High Resolution Methylome Map of Rat Indicates Role of Intragenic DNA Methylation in Identification of Coding Region. *PLoS ONE* 7:e31621.
- Saxonov S, Berg P, Brutlag DL (2006) A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:1412–1417.
- Schaefer M, Lyko F (2010) Solving the Dnmt2 enigma. *Chromosoma* 119:35–40.
- Schenk S (2002) Effects of GBR 12909, WIN 35,428 and indatraline on cocaine self-administration and cocaine seeking in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 160:263–270.
- Schmidl C, Klug M, Boeld TJ, Andreesen R, Hoffmann P, Edinger M, Rehli M (2009) Lineage-specific DNA methylation in T cells correlates with histone methylation and enhancer activity. *Genome Res* 19:1165–1174.

- Schwartz S, Meshorer E, Ast G (2009) Chromatin organization marks exon-intron structure. *Nat Struct Mol Biol* 16:990–995.
- 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.
- Shukla S, Kavak E, Gregory M, Imashimizu M, Shutinoski B, Kashlev M, Oberdoerffer P, Sandberg R, Oberdoerffer S (2011) CTCF-promoted RNA polymerase II pausing links DNA methylation to splicing. *Nature* 479:74–79.
- Siegmund KD, Connor CM, Campan M, Long TI, Weisenberger DJ, Biniszkiwicz D, Jaenisch R, Laird PW, Akbarian S (2007) DNA methylation in the human cerebral cortex is dynamically regulated throughout the life span and involves differentiated neurons. *PLoS One* 2:e895.
- Simmons RK, Stringfellow SA, Glover ME, Wagle AA, Clinton SM (2013) DNA methylation markers in the postnatal developing rat brain. *Brain Res* 1533:26–36.
- Smallwood SA, Tomizawa S, Krueger F, Ruf N, Carli N, Segonds-Pichon A, Sato S, Hata K, Andrews SR, Kelsey G (2011) Dynamic CpG island methylation landscape in oocytes and preimplantation embryos. *Nat Genet* 43:811–814.
- Smith SS, Kaplan BE, Sowers LC, Newman EM (1992) Mechanism of human methyl-directed DNA methyltransferase and the fidelity of cytosine methylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4744–4748.
- Solomon RL, Corbit JD (1973) An opponent-process theory of motivation. II. Cigarette addiction. *J Abnorm Psychol* 81:158–171.
- Song C-X, Szulwach KE, Fu Y, Dai Q, Yi C, Li X, Li Y, Chen C-H, Zhang W, Jian X, Wang J, Zhang L, Looney TJ, Zhang B, Godley LA, Hicks LM, Lahn BT, Jin P, He C (2011) Selective chemical labeling reveals the genome-wide distribution of 5-hydroxymethylcytosine. *Nat Biotechnol* 29:68–72.
- Sorm F, Veselý J (1968) Effect of 5-aza-2'-deoxycytidine against leukemic and hemopoietic tissues in AKR mice. *Neoplasma* 15:339–343.
- Spruijt CG *et al.* (2013) Dynamic Readers for 5-(Hydroxy)methylcytosine and Its Oxidized Derivatives. *Cell* 152:1146–1159.
- Stadler MB, Murr R, Burger L, Ivanek R, Lienert F, Schöler A, van Nimwegen E, Wirbelauer C, Oakeley EJ, Gaidatzis D, Tiwari VK, Schübeler D (2011) DNA-binding factors shape the mouse methylome at distal regulatory regions. *Nature* 480:490–495.
- Strahl BD, Allis CD (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* 403:41–45.
- Stranahan AM, Erion JR, Wosiski-Kuhn M (2013) Reelin signaling in development, maintenance, and plasticity of neural networks. *Ageing Res Rev* 12:815–822.
- Suetake I, Shinozaki F, Miyagawa J, Takeshima H, Tajima S (2004) DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction. *J Biol Chem* 279:27816–27823.
- Suganuma T, Workman JL (2011) Signals and combinatorial functions of histone modifications. *Annu Rev Biochem* 80:473–499.
- 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.
- Szulwach KE, Jin P (2014) Integrating DNA methylation dynamics into a framework for understanding epigenetic codes. *BioEssays* 36:107–117.
- Szulwach KE, Li X, Li Y, Song C-X, Wu H, Dai Q, Irier H, Upadhyay AK, Gearing M, Levey AI, Vasanthakumar A, Godley LA, Chang Q, Cheng X, He C, Jin P (2011) 5-hmC-mediated epigenetic dynamics during postnatal neurodevelopment and aging. *Nat Neurosci* 14:1607–1616.

T

- Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L, Rao A (2009) Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 324:930–935.
- Takebayashi S, Nakao M, Fujita N, Sado T, Tanaka M, Taguchi H, Okumura K (2001) 5-Aza-2'-deoxycytidine induces histone hyperacetylation of mouse centromeric heterochromatin by a mechanism independent of DNA demethylation. *Biochem Biophys Res Commun* 288:921–926.
- Tella SR, Schindler CW, Goldberg SR (1992) Cardiovascular effects of cocaine in conscious rats: relative significance of central sympathetic stimulation and peripheral neuronal monoamine uptake and release mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther* 262:602–610.
- Teytelman L, Ozaydin B, Zill O, Lefrançois P, Snyder M, Rine J, Eisen MB (2009) Impact of chromatin structures on DNA processing for genomic analyses. *PloS One* 4:e6700.
- 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.
- Thomsen M, Hall FS, Uhl GR, Caine SB (2009) Dramatically decreased cocaine self-administration in dopamine but not serotonin transporter knock-out mice. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 29:1087–1092.
- Tian W, Zhao M, Li M, Song T, Zhang M, Quan L, Li S, Sun ZS (2012) Reversal of cocaine-conditioned place preference through methyl supplementation in mice: altering global DNA methylation in the prefrontal cortex. *PloS One* 7:e33435.

U

- 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.
- Ungerstedt U (1971) Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. *Acta Physiol Scand Suppl* 367:1–48.
- United Nations Conference for the Adoption of a Single Convention on Narcotic Drugs (1961) Single Convention on Narcotic Drugs.
- United Nations Office on Drugs and Crime (2013) World drug report, 2013. New York: United Nations.

V

- Vanderschuren LJMJ, Everitt BJ (2004) Drug seeking becomes compulsive after prolonged cocaine self-administration. *Science* 305:1017–1019.
- Van Dyke C, Ungerer J, Jatlow P, Barash P, Byck R (1982) Intranasal cocaine: dose relationships of psychological effects and plasma levels. *Int J Psychiatry Med* 12:1–13.
- Varley KE, Gertz J, Bowling KM, Parker SL, Reddy TE, Pauli-Behn F, Cross MK, Williams BA, Stamatoyannopoulos JA, Crawford GE, Absher DM, Wold BJ, Myers RM (2013) Dynamic DNA methylation across diverse human cell lines and tissues. *Genome Res* 23:555–567.
- Vazquez V, Giros B, Daugé V (2006) Maternal deprivation specifically enhances vulnerability to opiate dependence. *Behav Pharmacol* 17:715–724.
- Veal CD, Freeman PJ, Jacobs K, Lancaster O, Jamain S, Leboyer M, Albanes D, Vaghela RR, Gut I, Chanock SJ, Brookes AJ (2012) A mechanistic basis for amplification differences between samples and between genome regions. *BMC Genomics* 13:455.

- Veloso A, Kirkconnell KS, Magnuson B, Biewen B, Paulsen MT, Wilson TE, Ljungman M (2014) Rate of elongation by RNA polymerase II is associated with specific gene features and epigenetic modifications. *Genome Res.*
- Villa R, Morey L, Raker VA, Buschbeck M, Gutierrez A, De Santis F, Corsaro M, Varas F, Bossi D, Minucci S, Pelicci PG, Di Croce L (2006) The methyl-CpG binding protein MBD1 is required for PML-RARalpha function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:1400–1405.
- Vinson C, Chatterjee R (2012) CG methylation. *Epigenomics* 4:655–663.
- 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. *Synap N Y N* 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.
- Waddington CH (1957) *The strategy of the genes: a discussion of some aspects of theoretical biology.* Allen & Unwin.
- Wade PA, Geggion A, Jones PL, Ballestar E, Aubry F, Wolffe AP (1999) Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nat Genet* 23:62–66.
- Wagner FA, Anthony JC (2002) From first drug use to drug dependence; developmental periods of risk for dependence upon marijuana, cocaine, and alcohol. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol* 26:479–488.
- Walter MJ, Ding L, Shen D, Shao J, Grillo M, McLellan M, Fulton R, Schmidt H, Kalicki-Weizer J, O’Laughlin M, Kandoth C, Baty J, Westervelt P, DiPersio JF, Mardis ER, Wilson RK, Ley TJ, Graubert TA (2011) Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 25:1153–1158.
- Wang G, Vasquez KM (2007) Z-DNA, an active element in the genome. *Front Biosci J Virtual Libr* 12:4424–4438.
- 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 Y, Zhang Y-L, Hennig K, Gale JP, Hong Y, Cha A, Riley M, Wagner F, Haggarty SJ, Holson E, Hooker J (2013) Class I HDAC imaging using [3H]ICI-994 autoradiography. *Epigenetics Off J DNA Methylation Soc* 8:756–764.
- Watt F, Molloy PL (1988) Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes Dev* 2:1136–1143.
- Watzl B, Watson RR (1990) Immunomodulation by cocaine--a neuroendocrine mediated response. *Life Sci* 46:1319–1329.
- Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Pääbo S, Rebhan M, Schübeler D (2007) Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet* 39:457–466.
- Weeks JR (1961) Self-maintained morphine addiction - a method for chronic programmed intravenous injections in unrestrained rats. *Fed Proc* 20:397.
- Wee S, Hicks MJ, De BP, Rosenberg JB, Moreno AY, Kaminsky SM, Janda KD, Crystal RG, Koob GF (2012) Novel cocaine vaccine linked to a disrupted adenovirus gene transfer vector blocks cocaine psychostimulant and reinforcing effects. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol* 37:1083–1091.
- Welch RD, Todd K, Krause GS (1991) Incidence of cocaine-associated rhabdomyolysis. *Ann Emerg Med* 20:154–157.

W

- Wiench M, John S, Baek S, Johnson TA, Sung M-H, Escobar T, Simmons CA, Pearce KH, Biddie SC, Sabo PJ, Thurman RE, Stamatoyannopoulos JA, Hager GL (2011) DNA methylation status predicts cell type-specific enhancer activity. *EMBO J* 30:3028–3039.
- Wigler MH (1981) The inheritance of methylation patterns in vertebrates. *Cell* 24:285–286.
- Williams K, Christensen J, Pedersen MT, Johansen JV, Cloos PAC, Rappsilber J, Helin K (2011) TET1 and hydroxymethylcytosine in transcription and DNA methylation fidelity. *Nature* 473:343–348.
- Wise RA (1980) Action of drugs of abuse on brain reward systems. *Pharmacol Biochem Behav* 13 Suppl 1:213–223.
- Wise RA, Bozarth MA (1987) A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychol Rev* 94:469–492.
- Wolf SF, Jolly DJ, Lunnen KD, Friedmann T, Migeon BR (1984) Methylation of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase locus on the human X chromosome: implications for X-chromosome inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:2806–2810.
- Wong Y-F, Jakt LM, Nishikawa S-I (2013) Prolonged treatment with DNMT inhibitors induces distinct effects in promoters and gene-bodies. *PLoS One* 8:e71099.
- Workman JL, Kingston RE (1998) Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu Rev Biochem* 67:545–579.
- Wu H, D'Alessio AC, Ito S, Wang Z, Cui K, Zhao K, Sun YE, Zhang Y (2011) Genome-wide analysis of 5-hydroxymethylcytosine distribution reveals its dual function in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells. *Genes Dev* 25:679–684.
- Wu SC, Zhang Y (2010) Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:607–620.
- Wu Y, Zhao Y, Ma X, Zhu Y, Patel J, Nie Z (2013) The Arf GAP AGAP2 interacts with β -arrestin2 and regulates β 2-adrenergic receptor recycling and ERK activation. *Biochem J* 452:411–421.
- Wyatt GR (1951) Recognition and estimation of 5-methylcytosine in nucleic acids. *Biochem J* 48:581–584.
- Wyatt GR, Cohen SS (1953) The bases of the nucleic acids of some bacterial and animal viruses: the occurrence of 5-hydroxymethylcytosine. *Biochem J* 55:774–782.

X

- Xiang S, Short SA, Wolfenden R, Carter CW (1995) Transition-state selectivity for a single hydroxyl group during catalysis by cytidine deaminase. *Biochemistry (Mosc)* 34:4516–4523.
- Xie W, Barr CL, Kim A, Yue F, Lee AY, Eubanks J, Dempster EL, Ren B (2012) Base-resolution analyses of sequence and parent-of-origin dependent DNA methylation in the mouse genome. *Cell* 148:816–831.
- Xing B, Liu P, Xu W-J, Xu F-Y, Dang Y-H (2014) Effect of microinjecting of 5-aza-2-deoxycytidine into ventrolateral orbital cortex on depressive-like behavior in rats. *Neurosci Lett* 574:11–14.
- Xu G-L, Bestor TH, Bourc'his D, Hsieh C-L, Tommerup N, Bugge M, Hulten M, Qu X, Russo JJ, Viegas-Péquignot E (1999) Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature* 402:187–191.

Y

- Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH (1997) Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet TIG* 13:335–340.
- Yoo CB, Cheng JC, Jones PA (2004) Zebularine: a new drug for epigenetic therapy. *Biochem Soc Trans* 32:910–912.
- You JS, Jones PA (2012) Cancer Genetics and Epigenetics: Two Sides of the Same Coin? *Cancer Cell* 22:9–20.

- Young JI, Hong EP, Castle JC, Crespo-Barreto J, Bowman AB, Rose MF, Kang D, Richman R, Johnson JM, Berget S, Zoghbi HY (2005) Regulation of RNA splicing by the methylation-dependent transcriptional repressor methyl-CpG binding protein 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:17551–17558.
- Yuferov V, Levran O, Proudnikov D, Nielsen DA, Kreek MJ (2010) Search for genetic markers and functional variants involved in the development of opiate and cocaine addiction and treatment. *Ann N Y Acad Sci* 1187:184–207.
- # Z
- Zacharias W, Jaworski A, Wells RD (1990) Cytosine methylation enhances Z-DNA formation in vivo. *J Bacteriol* 172:3278–3283.
- Zacharias W, O'Connor TR, Larson JE (1988) Methylation of cytosine in the 5-position alters the structural and energetic properties of the supercoil-induced Z-helix and of B-Z junctions. *Biochemistry (Mosc)* 27:2970–2978.
- Zhang H, Herman AI, Kranzler HR, Anton RF, Simen AA, Gelernter J (2012) Hypermethylation of OPRM1 promoter region in European Americans with alcohol dependence. *J Hum Genet* 57:670–675.
- Zhang Y, Liu T, Meyer CA, Eeckhoute J, Johnson DS, Bernstein BE, Nusbaum C, Myers RM, Brown M, Li W, Liu XS (2008) Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol* 9:R137.
- Zhu B, Zheng Y, Angliker H, Schwarz S, Thiry S, Siegmann M, Jost JP (2000a) 5-Methylcytosine DNA glycosylase activity is also present in the human MBD4 (G/T mismatch glycosylase) and in a related avian sequence. *Nucleic Acids Res* 28:4157–4165.
- Zhu B, Zheng Y, Hess D, Angliker H, Schwarz S, Siegmann M, Thiry S, Jost JP (2000b) 5-methylcytosine-DNA glycosylase activity is present in a cloned G/T mismatch DNA glycosylase associated with the chicken embryo DNA demethylation complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:5135–5139.
- Zhu J, He F, Hu S, Yu J (2008) On the nature of human housekeeping genes. *Trends Genet* 24:481–484.
- Ziller MJ, Müller F, Liao J, Zhang Y, Gu H, Bock C, Boyle P, Epstein CB, Bernstein BE, Lengauer T, Gnirke A, Meissner A (2011) Genomic distribution and inter-sample variation of non-CpG methylation across human cell types. *PLoS Genet* 7:e1002389.
- Zocchi L, Sassone-Corsi P (2012) SIRT1-mediated deacetylation of MeCP2 contributes to BDNF expression. *Epigenetics Off J DNA Methylation Soc* 7:695–700.

La modification de la méthylation de l'ADN régule le comportement d'auto-administration de cocaïne chez le rat. Caractérisation des gènes impliqués.

Résumé

La plasticité cérébrale pathologique qui se met en place en réponse à l'administration répétée de drogue nécessite des modifications de l'expression des gènes. Les régulations épigénétiques, telles que la méthylation de l'ADN, jouent un rôle prépondérant dans ces modifications. Au cours de ce travail, nous avons montré que l'inhibition des ADN méthyltransférases par la 5-aza-2'-désoxycytidine augmentait les propriétés renforçantes de la cocaïne dans le test d'auto-administration intraveineuse. L'analyse du méthylome dans le cortex préfrontal médian a permis d'identifier près de 188000 régions génomiques différentiellement méthylées suite à la prise de cocaïne, en association ou non avec la 5-aza-2'-désoxycytidine. Une vingtaine de régions situées dans les promoteurs ou au sein de gènes participant à la plasticité neuronale ont été sélectionnées afin de valider l'étude. Certains de ces gènes, comme *Hdac2*, ont montré une corrélation entre leurs variations de méthylation et d'expression.

Mots-clés : auto-administration intraveineuse de cocaïne ; épigénétique ; méthylation de l'ADN ; inhibiteurs des ADN méthyltransférases ; 5-aza-2'-désoxycytidine ; cortex préfrontal médian ; Hdac2

Summary

Repeated drug administration induces pathological brain plasticity that requires modifications of gene expression. This is partially achieved through epigenetic mechanisms such as DNA methylation. We show here that the DNA methyltransferase inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine increases the reinforcing properties of cocaine in an intravenous self-administration paradigm. The analysis of the methylome in the medial prefrontal cortex allowed us to identify approximately 188000 differentially methylated genomic regions in response to cocaine treatment, in association or not with 5-aza-2'-deoxycytidine. About 20 regions were selected, which displayed differential methylation within the gene promoters or in the gene bodies. The regions were situated in genes already known to be involved in neuronal plasticity. For some genes, a correlation could be established between modifications in DNA methylation and in gene expression. This was the case for instance of the *Hdac2* gene.

Keywords : intravenous cocaine self-administration ; epigenetics ; DNA methylation ; DNA methyltransferase inhibitors ; 5-aza-2'-deoxycytidine ; medial prefrontal cortex ; Hdac2