

Inserm

Institut national
de la santé et de la recherche médicale



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

THESE

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

L'inhibition des histones désacétylases régule le comportement d'auto-administration de cocaïne chez le rat

Lionel HOST

Soutenue publiquement le 30 avril 2010 devant le jury composé de :

Dr Valérie DAUGÉ	Université Pierre et Marie Curie, Paris	Rapporteur externe
Dr Marcello SOLINAS	Université de Poitiers	Rapporteur externe
Dr Ramon BERNABEU	Université de Buenos Aires	Examineur externe
Dr Michel BARROT	Université de Strasbourg	Examineur interne
Dr Christian KELCHE	Université de Strasbourg	Examineur interne
Dr Jean ZWILLER	Université de Strasbourg	Directeur de Thèse

Remerciements

Je voudrais tout d'abord dire « Merci » à Monsieur le Docteur Jean ZWILLER, mon directeur de thèse, pour la qualité de son encadrement scientifique et pédagogique, pour la richesse et l'originalité de ses idées et pour sa passion communicative de la Science. Je tiens à lui exprimer ma reconnaissance pour son enthousiasme, sa persévérance, sa générosité et sa disponibilité à chaque instant (même depuis la Serbie). J'ai énormément appris à travers nos longues conversations scientifiques et variées.

Je remercie Monsieur le Docteur Dominique AUNIS de m'avoir accueilli au sein de son Unité de recherche, à un tournant de l'histoire de celle-ci.

Ma reconnaissance va également à Madame le Docteur Valérie DAUGÉ et Monsieur le Docteur Marcello SOLINAS pour avoir acceptés de juger mon travail. Je suis honoré de leur présence dans ce jury.

Messieurs les Docteurs Michel BARROT et Ramon BERNABEU m'ont fait l'honneur d'examiner mon travail, qu'ils en soient vivement remerciés.

Que Monsieur le Docteur Christian KELCHE, qui m'a fait l'honneur de faire partie de ce jury, trouve ici le témoignage de toute ma gratitude.

Au cours de cette thèse j'ai eu la chance et la joie d'évoluer dans différents « environnements très enrichis » :

- La Faculté de Médecine de Strasbourg, où je tiens à remercier de tout cœur Pascal, un « mec » unique, toujours débordé, mais restant d'une gentillesse et disponibilité sans failles. A une époque, je passais plus de temps avec toi qu'avec ma fiancée vu que nous étions souvent les deux seuls fous au labo à 6h du matin. J'adresse également mes sincères remerciements à Serge Gobaille pour m'avoir appris à prélever des tout petits fragments de cerveau de rat, toujours avec un calme olympien. Merci à Carmen la technicienne HPLC, à Jacky, Julien et tous les autres animaliers du 7^{ème} pour leur disponibilité. Je tiens à remercier les membres de l'unité 666 : Guy Sandner pour son enthousiasme scientifique débordant, ses bricolages à la MacGyver et ses récits de voyage délassants, Marie-José Angst, Astrid Nehlig, Jennifer François, Francisca Meyer pour nos discussions dans le long couloir du 5^{ème} et enfin et surtout Arielle Ferrandon pour son aide précieuse en histologie, sa bonne humeur communicative (sauf trop tôt le matin) et pour nos discussions au sujet de tout et n'importe quoi.

- Le Centre de Neurochimie, où je tiens à remercier chaleureusement tous les membres de notre équipe ; Marie-Odile pour m'avoir appris les techniques immunohistochimiques, pour m'avoir nourri de produits sains et pour nos discussions sur les animaux ; Patrick pour son expertise concernant la RT-qPCR et pour son humour grinçant ; Jean-Bernard « JB » pour son partenariat scientifique efficace et sa bonne humeur communicative ; Claude pour ses prévisions météo qui m'ont permis plus d'une fois de rentrer en vélo entre les gouttes. Je voudrais aussi remercier Patricia, Martine, Sylvie et Bernard pour leur gentillesse et pour nos petites discussions dans le «laboratoire de caféomique». Merci aussi à Suzanne Cassel pour m'avoir un jour sauvé lorsque j'étais en plein « craving » de cocaïne.

- La Faculté de Médecine de Buenos Aires, où je remercie Ramon « Rudy » Bernabeu pour m'avoir raconté sa ville et pour nos discussions franco-anglo-hispaniques. Merci aussi à Maria Faillace, Mariano Pascual, Victoria Rosato, Veronica Pastor, Guillermina Boquita et tous les autres pour s'être décarcassés afin de me faciliter au maximum ce séjour, qui restera pour moi inoubliable.

- La Faculté de Psychologie, où seront installés les nouveaux locaux de l'équipe. J'y remercie tous les membres du LINC et plus particulièrement les Docteur Christian Kelche et Anne Pereira de Vasconcelos pour m'avoir accueilli au sein de leur plate-forme de microscopie.

- L'IGBMC où j'aimerais remercier Christelle Thibault et Doulaye Dembele pour avoir effectué les microarrays et pour m'avoir aidé dans les analyses et la mise en ligne des données.

J'aimerais adresser un « Merci » très particulier aux trois doctorantes de l'équipe : Delphine, ma prédécesseur au sourire permanent, je te souhaite bonne route ; Elodie, la fille avec laquelle je partage finalement l'amour de la vraie nature ; Sarah, la petite dernière qui adore le bon fromage et rigole tout le temps.

Merci aussi à tous les petits rats français et ratas argentins de 250g, je pense que vous n'êtes pas partis au paradis des rongeurs pour rien.

Merci Vazigen et Véga...gnnn.

Pour finir j'aimerais remercier tous les membres de ma famille, qui s'est officiellement agrandie depuis peu, pour m'avoir soutenu du matin (parfois très tôt) au soir.

Finalement, et même si les mots me manquent pour exprimer ce que je ressens à leur égard :

Merci Maman pour avoir toujours été présente, et m'avoir donné le goût de la Recherche.

Merci Mélanie, mon épouse, pour ton enthousiasme, ta patience, ta présence
et surtout pour tes petits coups de fil du matin.

Je te dédie cette thèse.

Table des matières

Liste des publications	I
Liste des communications	III
Liste des illustrations	V
Liste des tableaux	VII
Liste des abréviations	IX

A. Contexte Scientifique **1**

1. La Cocaïne	3
1.1. Origine	3
1.2. Production et commerce	5
1.2.1. La pâte de coca.....	5
1.2.2. La cocaïne base	6
1.2.3. La cocaïne HCl.....	6
1.2.4. Le crack.....	6
1.2.5. Le commerce	7
1.3. Pharmacocinétique	7
1.4. Catabolisme	7
1.5. Effets somatiques	9
1.5.1. Manifestations neurologiques	9
1.5.2. Activité anesthésique locale.....	9
1.5.3. Toxicité cardio-vasculaire.....	9
1.5.4. Toxicité pulmonaire	10
1.5.5. Autres effets toxiques.....	10
1.6. Effets comportementaux	10
1.6.1. Administration aiguë.....	10
1.6.2. Administration chronique.....	11
1.7. Facteurs de vulnérabilité	11
1.8. La dépendance aux drogues	12
1.8.1. Diagnostic	12
1.8.2. Théories de la dépendance	14
1.8.2.1. Renforcement positif et négatif.....	14
1.8.2.2. Processus opposants	15
1.8.2.3. Dérégulation de l'homéostatique / allostasie.....	15
1.8.2.4. Apprentissage procédural aberrant	16
1.8.2.5. Sensibilisation de l'incitation / de la motivation.....	17
1.9. Sevrage et rechute	17
1.10. Thérapies existantes et nouvelles	18
1.10.1. Traitements du sevrage	18
1.10.2. Traitements de fond	18
1.10.3. Psychothérapie comportementale	20
2. Neurotransmetteurs impliqués dans les effets de la cocaïne	21
2.1. Le circuit de récompense	21
2.2. Le système dopaminergique	22
2.2.1. Synapse dopaminergique	22
2.2.1.1. Métabolisme de la dopamine.....	22

2.2.1.2. Régulation de la tyrosine hydroxylase	24
2.2.1.3. Les transporteurs	24
2.2.1.4. Les récepteurs	26
2.2.1.4.1. Transduction du signal	27
2.2.1.4.2. Auto-administration et dopamine	28
2.2.2. Anatomie des voies dopaminergiques	28
2.2.3. Rôle de la dopamine dans les processus de récompense	30
2.3. Le système sérotoninergique	31
2.3.1. Synapse sérotoninergique	32
2.3.1.1. Métabolisme de la sérotonine	32
2.3.1.2. Récepteurs sérotoninergiques	33
2.3.2. Voies sérotoninergiques	34
2.4. Le système noradrénergique	35
2.5. Interactions avec les autres systèmes de neurotransmetteurs	37
2.5.1. Système GABAergique	37
2.5.2. Système glutamatergique	38
2.5.3. Système opioïde	39
2.5.4. Système cannabinoïde	40
2.6. Cocaïne et expression génique	41
3. Les modèles d'études comportementales des effets de la cocaïne	43
3.1. Activité locomotrice et sensibilisation comportementale	43
3.2. Discrimination de drogues	44
3.3. Conditionnement de préférence de place	45
3.4. Auto-administration	47
4. L'épigénétique	51
4.1. Histoire et définition	51
4.2. Chromatine et nucléosome	52
4.3. Modifications épigénétiques	55
4.3.1. Les histones et leurs variants	56
4.3.2. Méthylation de l'ADN	57
4.3.3. Les modifications posttraductionnelles des histones	60
4.3.3.1. Acétylation	61
4.3.3.2. Désacétylation	62
4.3.3.2.1. HDAC de la classe I	65
4.3.3.2.2. HDAC de la classe II	65
4.3.3.2.3. HDAC de la classe IV	67
4.3.3.2.4. HDAC de la classe III	67
4.3.3.2.5. Inhibiteurs de HDAC	68
4.3.3.3. Méthylation / déméthylation	72
4.3.3.4. Phosphorylation	74
4.3.3.5. Ubiquitylation et SUMOylation	74
4.3.3.6. ADP-ribosylation	75
4.3.3.7. Biotinylation, déimination et glycoxydation	75
4.3.4. Hypothèse de l'existence d'un « code des histones »	76
4.3.5. ARN interférents et facteurs de remodelage de la chromatine	77
dépendant de l'ATP	77
4.4. Transmission des marques épigénétiques	78
4.5. Plasticité neuronale et influence de l'environnement	79
4.6. Modifications épigénétiques et maladies neurologiques	80
4.7. Modifications épigénétiques et drogues	81

B. Résultats Expérimentaux

83

1. Publication n°1	85
1.1. Résultats complémentaires	94
1.1.1. Le FR1.....	94
1.1.1.1. Détermination de la cinétique d'inhibition des HDAC.....	94
1.1.1.2. Courbe dose-réponse en FR1	95
1.1.1.3. Effet du phénylbutyrate sur le FR1	95
1.1.1.4. Effet de la TsA sur une plus forte dose de cocaïne.....	96
1.1.1.5. Réversibilité de l'effet de la TsA	97
1.1.2. Le PR.....	98
1.1.2.1. Courbe dose-réponse en PR.....	98
1.1.2.2. Effet de la dépuécine sur le PR	99
1.1.2.3. Effet de la TsA lorsqu'elle est injectée uniquement en PR.....	100
1.1.3. Expériences contrôles et mesures d'activités HDAC.....	101
1.1.3.1. Effet des HDACi sur la prise de poids des animaux	101
1.1.3.2. Effet de la TsA sur l'activité exploratoire	102
1.1.3.3. Effet de l'AA de cocaïne et de saccharose sur l'activité HDAC	102
2. Publication n°2	105
3. Publication n°3	117
4. Publication n°4	139
4.1. Résultats complémentaires	149
4.1.1. Le FR1.....	149
5. Publication n°5	151
5.1. Annexe 1	165
5.2. Annexe 2	169
5.3. Résultats complémentaires	170
5.3.1. La Reeline et Lis1 sont régulés par la TsA dans le CPu	170
5.3.2. La Reeline et Lis1 sont régulés par la fluoxétine dans le CPU.....	170

C. Discussion

173

1. Effets de l'inhibition des HDAC sur l'AA de cocaïne	175
1.1. Justification des protocoles utilisés	175
1.1.1. Ratio fixe.....	175
1.1.2. Ratio progressif	177
1.1.3. HDACi	178
1.2. Modification du comportement des rats par les HDACi	179
1.2.1. Concernant l'AA de cocaïne	179
1.2.2. Inhibition par la TsA de l'activité HDAC chez les rats	180
s'auto-administrant de la drogue.....	180
1.2.3. Réversibilité de l'effet de la TsA	181
1.2.4. Les HDACi ne modifient pas l'AA de saccharose.....	181
1.2.5. Drogue et renforçants naturels n'ont pas les mêmes effets sur	182
l'activité HDAC	182
1.2.6. Perturbation de la sensibilisation locomotrice par les HDACi	182
1.2.7. Blocage de la rechute aux drogues par les HDACi.....	184
1.3. Conclusions et perspectives	184
2. Effet de l'inhibition des HDAC sur la CPP à la nicotine	186
2.1. Justification du protocole utilisé	186
2.2. Diminution des propriétés récompensantes de la nicotine par les HDACi	186
2.3. Conclusions et perspectives	187

3. Effet des drogues et des HDACi sur l'expression génique	188
3.1. AA de cocaïne et expression génique	188
3.1.1. Cocaïne et FR1	188
3.1.2. Corrélation entre expression des HDAC et activité HDAC.....	189
3.1.3. Inhibition des HDAC et expression des facteurs de régulation	190
épigénétique de la transcription	190
3.2. CPP à la nicotine et expression génique	191
3.3. Analyse par microarrays des gènes régulés par la TsA chez les rats	192
s'auto-administrant de la cocaïne	192
3.3.1. Régulation d'environ 2% des échantillons par la TsA.....	192
3.3.2. Identification des échantillons régulés par la TsA	193
3.3.3. Validation des microarrays	195
3.4. Conclusions et perspectives	196
4. Liens entre Lis1, la Reeline et la cocaïne	198
4.1. Régulation analogue de l'expression de la Reeline et de Lis1 par la TsA	198
4.2. Lis1 et drogues	199
4.3. Reeline et drogues	200
4.4. Lis1, Reeline et troubles psychiatriques	200
4.5. Conclusions et perspectives	201
5. Conclusion générale	203

D. Matériels et Méthodes **205**

1. Animaux et tests comportementaux	207
1.1. Traitements pharmacologiques	207
1.2. Implantation stéréotaxique des guides canules	208
1.3. Auto-administration de cocaïne	208
1.3.1. Construction du cathéter	208
1.3.2. La chirurgie	209
1.3.3. La chambre d'auto-administration	209
1.3.4. Protocoles d'auto-administration de cocaïne	210
1.3.4.1. <i>Ratio fixe</i>	210
1.3.4.2. <i>Ratio progressif</i>	212
1.4. Auto-administration de saccharose	213
1.4.1. Particularités de la chambre	213
1.4.2. Protocoles d'auto-administration de saccharose	213
1.5. Test de préférence au saccharose	214
1.6. Activité locomotrice	214
1.6.1. Cage d'activité locomotrice	214
1.6.2. Activité locomotrice spontanée.....	214
1.6.3. Sensibilisation comportementale	215
1.7. Préférence de place induite par la nicotine	215
1.7.1. Cage d'expérimentation	215
1.7.2. Protocole de conditionnement.....	216
2. Techniques biochimiques	217
2.1. Prélèvements de structures cérébrales	217
2.2. Dosage de l'activité HDAC	218
2.2.1. Extraction de la fraction nucléaire	218
2.2.2. Dosage des protéines.....	218
2.2.3. Dosage de l'activité enzymatique	219
2.3. Analyse génomique	219

2.3.1. Extraction des ARN	219
2.3.2. Analyse de la qualité des ARN	220
2.3.3. Microarrays	221
2.3.3.1. <i>Principe de l'expérience</i>	221
2.3.3.2. <i>Analyse statistique</i>	223
2.3.4. RT-qPCR.....	224
2.3.4.1. <i>Principe</i>	224
2.3.4.2. <i>Transcription réverse</i>	226
2.3.4.3. <i>La réaction de polymérisation en chaîne quantitative</i>	226
2.3.4.3.1. <i>Etapas d'amplification</i>	226
2.3.4.3.2. <i>Contrôles</i>	227
2.3.4.3.3. <i>Création des couples d'amorces</i>	227
2.4. Etudes immunologiques	229
2.4.1. Perfusion intracardiaques et coupes	229
2.4.2. Les anticorps	230
2.4.3. Marquage immunohistochimique	230
2.4.3.1. <i>Révélation à la peroxydase</i>	230
2.4.3.2. <i>Marquages fluorescents</i>	231

E. Références Bibliographiques

Liste des publications

Articles approuvés par un comité scientifique de lecture et présentés dans la thèse :

Romieu P, Deschatrettes E, **Host L**, Gobaille S, Sandner G, Zwiller J (2010). The inhibition of histone deacetylases reduces the reinstatement of cocaine seeking behavior in rats. *Curr Neuropharmacol* (Sous presse).

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 JB, Carouge D, Aunis D, Zwiller J (2009). Cocaine self-administration alters the expression of chromatin-remodeling proteins; modulation by HDAC inhibition. *J Psychopharmacol* (Sous presse, PMID : 19939859)

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. (PR et LH ont contribué de façon équivalente à ce travail)

Article approuvé par un comité scientifique de lecture et non présenté dans la thèse :

Carouge D, **Host L**, Aunis D, Zwiller J, Anglard P (2010). CDKL5 is a brain MeCP2 target gene regulated by methylation. *Neurobiol Dis* 38:414-424.

Article soumis pour publication et présenté dans la thèse :

Pastor V, **Host L**, Zwiller J, Bernabeu RO. Inhibition of histone deacetylases abolishes nicotine-conditioned place preference. (VP et LH ont contribué de façon équivalente à ce travail)

Article soumis pour publication résultant de travaux en collaboration et non présenté dans la thèse :

Sandner G, **Host L**, Angst MJ, Guiberteau T, Guignard B, Zwiller J. The HDAC Inhibitor Phenylbutyrate Reverse Effects of Neonatal Ventral Hippocampal Lesion in Rats.

Liste des communications

Zwiller J, **Host L**, Romieu P, Carouge D, Dietrich JB, Anglard P
Gene expression in dopaminergic brain structures of rats self-administering cocaine. Effect of histone deacetylase inhibition.
2nd International Drug Abuse Research Society (IDARS) Meeting, Séoul, Corée du Sud, 2009.
Communication orale

Host L, Anglard P, Romieu P, Thibault D, Dembele D, Aunis D, Zwiller J
Effect of the histone deacetylase inhibitor trichostatine A on the expression of Lis1 and TSC22 genes in dopaminergic brain structures of rats self-administering cocaine.
Neurex annual meeting, Illkirch, France, 2009. Affiche

Deschatrettes E, Romieu P, **Host L**, Zwiller J
The cGMP / PKG pathway modulates cocaine self-administration in rats.
Neurex annual meeting, Illkirch, France, 2009. Affiche

Host L, Anglard P, Romieu P, Thibault D, Dembele D, Aunis D, Zwiller J
Effect of the histone deacetylase inhibitor trichostatine A on the expression of Lis1 and TSC22 genes in dopaminergic brain structures of rats self-administering cocaine.
9^{ème} Colloque de la Société Française des Neurosciences, Bordeaux, France, 2009. Affiche

Zwiller J, Romieu P, **Host L**, Carouge D, Anglard P, Aunis D
Epigenetic parameters are regulated by cocaine and modulate cocaine self-administration in rats.
International Symposium on Drug Abuse, Açores, Portugal, 2008. Communication orale

Host L, Romieu P, Gobaille S, Sandner G, Aunis D, Zwiller J
Inhibition of histone deacetylase results in a decrease of cocaine, but not sucrose self-administration.
6th FENS Forum of European Neuroscience, Genève, Suisse, 2008. Affiche

Zwiller J, Romieu P, **Host L**, Gobaille S, Anglard P, Dietrich JB, Aunis D
Cocaine and epigenetic regulation: induction of MeCP2 and decrease in cocaine self-administration by HDAC inhibitors.
The First Annual International Drug Abuse Research Society Meeting, Merida, Mexique, 2007. Communication orale

Romieu P, **Host L**, Gobaille S, Aunis D, Zwiller J
HDAC inhibitors decrease intravenous cocaine self-administration in rats.
8^{ème} Colloque de la Société Française des Neurosciences, Montpellier, France, 2007. Affiche

Le nom souligné indique la personne ayant présenté la communication.

Liste des illustrations

<i>Figure 1 : Illustrations d'une plante d'Erythroxylum coca</i>	3
<i>Figure 2 : Structure du chlorhydrate de cocaïne</i>	4
<i>Figure 3 : Poudre de cocaïne HCl</i>	6
<i>Figure 4 : Galets de crack</i>	6
<i>Figure 5 : Catabolisme de la cocaïne</i>	8
<i>Figure 6 : Théories de la dépendance</i>	16
<i>Figure 7 : Biosynthèse de la DA</i>	22
<i>Figure 8 : Catabolisme de la DA</i>	23
<i>Figure 9 : Mécanismes d'action de la cocaïne</i>	25
<i>Figure 10 : Les voies dopaminergiques de projection longue</i>	29
<i>Figure 11 : Synthèse et dégradation de la 5-HT</i>	33
<i>Figure 12 : Voies sérotoninergiques</i>	35
<i>Figure 13 : La compaction croissante du filament d'ADN</i>	52
<i>Figure 14 : Le nucléosome</i>	53
<i>Figure 15 : Transition entre chromatine condensée et décondensée en réponse aux signaux environnementaux</i>	55
<i>Figure 16 : La méthylation de l'ADN</i>	57
<i>Figure 17 : Rôle de MeCP2 dans la répression transcriptionnelle</i>	59
<i>Figure 18 : L'acétylation des Lys</i>	62
<i>Figure 19 : Distribution des 11 HDAC dans le cerveau de rat</i>	63
<i>Figure 20 : Le pharmacophore type des HDACi</i>	69
<i>Figure 21 : La méthylation des histones sur les résidus Arg</i>	73
<i>Figure 22 : La méthylation des histones sur les Lys</i>	73
<i>Figure 23 : Effet potentiel d'une intervention comportementale ou pharmacologique sur la courbe dose-réponse de la cocaïne</i>	177
<i>Figure 24 : L'AA de cocaïne par le rat</i>	211
<i>Figure 25 : Protocole de PR</i>	212
<i>Figure 26 : La préférence de place</i>	216
<i>Figure 27 : Schéma des niveaux de coupes du cerveau de rat</i>	218
<i>Figure 28 : Schéma de l'expérience des microarrays</i>	222
<i>Figure 29 : Analyse par qPCR quantitative de l'expression de gènes</i>	225
<i>Figure 30 : Schéma représentant les différents niveaux de coupe</i>	229

Liste des tableaux

<i>Tableau 1 : Critères de la dépendance selon le DSM-IV-TR</i>	<i>13</i>
<i>Tableau 2 : Critères de la dépendance selon le CIM-10</i>	<i>14</i>
<i>Tableau 3 : Effets des drogues sur le système de récompense</i>	<i>21</i>
<i>Tableau 4 : Comparaison des caractéristiques de la sensibilisation, de la CPP et de l'AA</i>	<i>50</i>
<i>Tableau 5 : Les différents types de modifications des histones</i>	<i>60</i>
<i>Tableau 6 : Résidus modifiés des différentes histones</i>	<i>61</i>
<i>Tableau 7 : Les différentes HDAC</i>	<i>64</i>
<i>Tableau 8 : Les différentes classes de HDACi, leurs structures et leurs avancés cliniques en oncologie</i>	<i>70</i>
<i>Tableau 9 : Maladies connues pour être dues à des dysfonctionnements épigénétiques</i>	<i>81</i>
<i>Tableau 10 : Liste des gènes modulés par la TsA communs entre le CgCx et le NAc</i>	<i>195</i>
<i>Tableau 11 : Couples d'amorces utilisées dans l'ensemble des études</i>	<i>228</i>
<i>Tableau 12 : Liste des anticorps primaires utilisés</i>	<i>230</i>
<i>Tableau 13 : Liste des anticorps secondaires utilisés</i>	<i>230</i>

Liste des abréviations

Certaines abréviations sont basées sur le nom en anglais du fait de leur usage courant au sein de la communauté scientifique française.

Les acides aminés sont représentés par le code à 3 lettres (Arg ; arginine, etc.), à l'exception du glutamate, non abrégé lorsqu'il est fait référence au neurotransmetteur.

5-HT :	sérotonine, 5-hydroxytryptamine
AA :	auto-administration
ADNc :	ADN complémentaire
AMPA :	α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate
BDNF :	« brain derived neurotrophic factor »
CaM :	calmoduline
CgCx :	cortex cingulaire antérieur
CPA :	conditionnement d'aversion de place
CPF :	cortex préfrontal
CPP :	conditionnement de préférence de place
CPu :	caudé-putamen
(p)CREB :	« (phospho-)cAMP responsive element binding protein »
DA :	dopamine
DAT :	transporteur membranaire de la dopamine
DMSO :	diméthylsulfoxyde
DNMT :	ADN méthyltransférases
FMR1 :	« fragile X mental retardation gene-1 »
FR :	« fixed ratio »
GABA :	acide γ -amino-butérique
HAT :	histone acétyltransférase
HDAC :	histone désacétylase
HDACi :	inhibiteurs de HDAC
i.c.v. :	intracérébroventriculaire
i.p. :	intrapéritonéal
i.v. :	intraveineux
L-DOPA :	L-dihydroxyphénylalanine
Lis1 (= Pafah1b1) :	« lissencephaly-gene 1 » (= « platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform 1b, α subunit »)
MBD :	protéine de liaison à l'ADN méthylé
MeCP2 :	« methyl CpG binding protein 2 »
MEF2 :	« myocyte enhancer factor 2 »
MSK1/2 :	« mitogen- and stress-activated kinase 1 and 2 »
NAc (S / C) :	noyau accumbens (shell / core)
NAD ⁺ :	nicotinamide adénine dinucléotide
NMDA :	N-Méthyl-D-Aspartate
NP :	« nose-poke » = introduction du museau dans les orifices de la chambre d'AA
PBS :	« phosphate buffered saline »
PhB :	acide phénylbutyrique
PR :	« progressive ratio »

RT-qPCR :	transcription réverse-réaction de polymérisation en chaine quantitative
SAHA :	acide subéroylanilide hydroxamique
s.c. :	sous-cutané
SERT :	transporteur membranaire de la sérotonine
SET :	« su(var)39 enhancer trithorax »
SNC :	système nerveux central
SUMO :	« small ubiquitin-related modifier »
TsA :	trichostatine A
TSC22 :	« transforming growth factor- β stimulated clone-22 »
VMAT :	transporteur vésiculaire des monoamines
VTA :	aire tegmentale ventrale

A. Contexte Scientifique

1. La Cocaïne

La production, la consommation et le trafic de substances illicites, telles que la cocaïne, constituent un problème majeur de santé publique auquel se heurte la société. En effet, une hausse globale de la consommation de cocaïne a été observée dans l'Union Européenne au cours de la dernière décennie (*Observatoire Européen des Drogues et des Toxicomanies, 2009*). Les données disponibles font état d'une diversité considérable chez les consommateurs, tant en termes de mode de consommation qu'en termes de sociologie. Le groupe le plus important est constitué d'usagers qui ne font qu'expérimenter la substance à de rares occasions. Un second groupe comprend des consommateurs réguliers socialement bien intégrés. Enfin, un troisième groupe comprend des consommateurs très réguliers, mais exclus socialement. En raison de la diversité des profils des consommateurs de cocaïne, l'évaluation de la prévalence de la consommation de cette drogue, ses conséquences sanitaires et sociales ainsi que les réponses nécessaires représentent de nombreux défis. L'essentiel des études a porté sur les causes sociales, psychologiques ou psychiatriques qui amènent un individu à la prise de drogue. Cependant, la nécessité d'études d'ordre neurobiologique, pour comprendre pourquoi de nombreux consommateurs perdent totalement le contrôle de leur prise de drogue, demeure. L'action répressive s'oriente quant à elle systématiquement vers les personnes, leurs provenances et la surveillance de leurs activités. Si de nombreuses saisies sont effectuées, leur effet sur l'ampleur du trafic reste modeste en regard des moyens investis.

1.1. Origine

La cocaïne est un alcaloïde extrait des feuilles de deux espèces de cocaïer : *Erythroxylum coca* et *Erythroxylum novogranatense*. Ces arbustes se trouvent principalement le long de la Cordillère des Andes. Bien que poussant à l'état sauvage, l'arbuste à coca est cultivé, généralement entre 500 et 1500 m d'altitude, en climat humide. Les rameaux, de coloration rougeâtre, portent des feuilles ovales vert foncé (Figure 1), des fleurs blanches et des fruits rouges. Les feuilles de ces arbustes contiennent jusqu'à quatorze alcaloïdes, présents à des concentrations variables.

Figure 1 : Illustrations d'une plante d'*Erythroxylum coca*

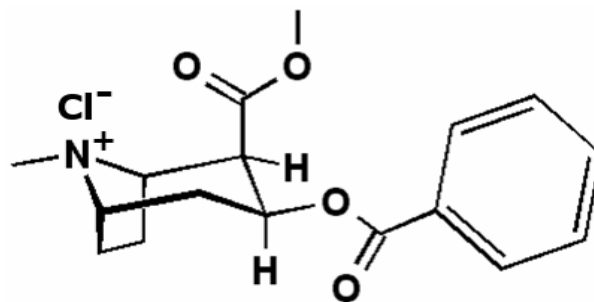


La « Khoca » qui signifie « l'arbre par excellence » en langue aymara, était cultivée bien avant l'empire Inca. La plante était vénérée par les sociétés andines qui étudiaient l'usage des plantes. Sa consommation avait acquis un caractère mystique et magique, mais aussi religieux et social. Ainsi, l'utilisation de la feuille se révélait omniprésente dans les relations des hommes avec les dieux et les forces naturelles (Lebeau, 2006). Plante médicinale de premier ordre, elle était déjà utilisée pour ses propriétés anesthésiques, lors des interventions chirurgicales bien avant la découverte de l'anesthésie locale en Europe.

Les feuilles de coca étaient consommées sous forme d'une chique, que l'on mastiquait pendant quelques heures. Le sujet portait à sa bouche quelques feuilles de coca et de petits fragments d'une substance alcaline (de la cendre ou de la chaux vive) puis formait une boule simplement maintenue entre la gencive et la joue afin d'extraire lentement le suc des feuilles. L'appareil digestif en était anesthésié, l'usager ne ressentait plus la faim. Cette consommation permettait aussi de se protéger du froid de l'altitude. Dans les mines d'or, d'argent et d'étain des Andes, son usage est aujourd'hui encore considéré par les mineurs comme un moyen de protection de leur santé, ainsi qu'un stimulant dans leur travail.

Ce n'est qu'au Siècle des Lumières que l'Europe commença à s'intéresser à cette plante. En 1750, le botaniste De Jussieu décrivit les premiers spécimens. Lamarck la nomma *Erythroxylum coca* en 1786. En 1855, Gaedcke distilla le résidu sec d'un extrait de coca et obtint un produit cristallin qu'il nomma « Erythroxylin ». En 1859, le naturaliste Von Scherzer envoya des feuilles au chimiste Wöhler et c'est en 1860 qu'un de ses élèves, Niemann, isola un alcaloïde de ses feuilles qu'il nomma cocaïne (Niemann, 1860). Trois ans plus tard, Lossen en détermina la formule chimique $C_{17}H_{21}NO_4$ (Figure 2).

Figure 2 : **Structure du chlorhydrate de cocaïne**



La découverte de la cocaïne en tant qu'anesthésique local provoqua un bouleversement dans divers domaines de la médecine : une simple application locale autorisait les interventions chirurgicales les plus complexes sur le sujet vigile (Taylor, 1884). Les applications thérapeutiques de la cocaïne furent la chirurgie (ophtalmologie, urologie, gynécologie), le traitement par substitution de l'alcoolisme, l'opiomanie et l'asthme. Les

propriétés « stimulantes » de la cocaïne furent mises à profit pour créer différentes boissons. Le vin Mariani, par exemple, commercialisé en 1863 par un pharmacien corse du même nom, contenait de fortes doses de cocaïne. Cette préparation inspira dès 1885 John Pemington, un pharmacien américain, qui élaborait la boisson Coca-Cola. Cette boisson aux propriétés toniques contenait des extraits de feuilles de coca, source de cocaïne, et des extraits de noix de cola, source de caféine. La cocaïne ne fut définitivement retirée de cette boisson qu'en 1929. A la même époque, un procédé de consommation plus simple et plus efficace fut découvert : il consistait à inhaler la poudre de cocaïne. Celle-ci était alors de toutes les fêtes ; elle jouissait d'un grand succès en tant que « drogue du plaisir » et son usage se répandit dans toutes les classes sociales. Cette « période d'or » de la « divine coco » allait s'étendre de la moitié du XIX^{ème} siècle jusqu'au tout début du XX^{ème}, au moment où son utilisation massive et chronique provoqua un véritable malaise dans les sociétés américaine et européennes.

En 1884, Freund publia son article « Über Coca » décrivant les effets bénéfiques de la cocaïne (Freund, 1884). Un an après, les premiers cas d'effets toxiques furent publiés, tendance qui s'amplifia jusqu'au début des années 1900. Les premiers cas de dépendance furent également décrits à cette époque. On parla à cette occasion d'une « épidémie » de consommation de cocaïne. Les Etats-Unis avaient par deux fois émis des restrictions à cette consommation (Pure Food Act de 1906 et Harrison Narcotic Act de 1914). En France, ce n'est qu'en 1916 qu'apparut une liste de stupéfiants et une loi prohibant l'usage des drogues. Dans les années 1970 apparut une seconde « épidémie » de consommation de cocaïne largement amplifiée dans les années 1980 avec l'émergence du « crack ». Cette forme de la cocaïne, insoluble dans l'eau, pouvait être fumée car son point de vaporisation est beaucoup moins élevé que celui du chlorhydrate de cocaïne. Depuis 1977, le trafic, l'utilisation et les décès dus à la consommation de cocaïne sont en augmentation constante.

1.2. Production et commerce

1.2.1. La pâte de coca

Pour obtenir la pâte de coca (Casale and Klein, 1993), il faut faire macérer les feuilles de coca dans de l'eau en présence d'un sel de carbonate, afin de s'assurer que la cocaïne est sous sa forme de base libre. Ensuite, un solvant non miscible à l'eau est ajouté pour que la cocaïne sous forme de base soit extraite dans ce solvant. Le solvant est ensuite récupéré et de l'acide sulfurique dilué y est ajouté pour transformer la cocaïne en son sel sulfaté, soluble en solution aqueuse. Dans la phase finale un excès de base (hydroxyde de calcium ou hydroxyde de

sodium) est ajouté à la solution aqueuse pour neutraliser l'acide sulfurique et convertir le sulfate de cocaïne en cocaïne base qui précipite dans la solution aqueuse sous la forme d'une gomme jaunâtre. La substance solide ainsi récupérée est la pâte de coca.

1.2.2. La cocaïne base

Pour obtenir la cocaïne sous sa forme basique, la pâte de coca est dissoute dans une petite quantité d'acide sulfurique, puis la solution est titrée avec du permanganate de potassium, un puissant oxydant, et de l'ammoniaque afin de précipiter la cocaïne base. L'obtention de celle-ci est généralement effectuée par les récoltants eux-mêmes dans des conditions d'hygiène déplorable et avec un grand risque pour leur santé, vus les produits utilisés.

1.2.3. La cocaïne HCl

Dans cette étape, la cocaïne sous sa forme basique est dissoute dans du diéthyléther, puis filtrée pour la débarrasser d'une grande partie de ses impuretés. De l'acétone et de l'acide chlorhydrique concentré sont ajoutés pour obtenir le sel hydrochloré de cocaïne. Avant d'être vendue sous forme de poudre, la cocaïne HCl est fréquemment « coupée », adultérée avec d'autres substances.



Figure 3 : **Poudre de cocaïne HCl**

1.2.4. Le crack

A partir de cocaïne HCl, il est possible de fabriquer du « crack », nom communément donné à la cocaïne sous sa forme basique. Ce sont fréquemment les vendeurs eux-mêmes qui la produisent en faisant précipiter le chlorhydrate de cocaïne dans de l'eau bouillante en présence de bicarbonate de sodium. La base est alors éventuellement mélangée à du tabac, du chanvre ou d'autres herbes, pour être fumée.



Figure 4 : **Galets de crack**

1.2.5. Le commerce

Pour l'année 2008, les trois principaux pays producteurs de cocaïne ont été la Colombie, le Pérou et la Bolivie avec une production respective d'environ 430, 300 et 110 tonnes (*United Nations Office on Drugs and Crime, 2009*). Depuis 2000, le prix de la cocaïne chute en Europe et sa consommation ne cesse de croître. En 2000, 1,9 % des 15-34 ans déclarent avoir consommé de la cocaïne au cours de la vie et 0,5 % au cours de l'année. À 17 ans, à la même époque, son niveau d'expérimentation s'élève à 1 % de la classe d'âge, il est de 2,5% en 2005. C'est à partir de cette période que les courbes d'usage de la cocaïne vont sensiblement s'orienter vers la hausse. Ainsi, dans le groupe d'âge le plus concerné par ces usages, les 18-44 ans, le niveau d'expérimentation triple entre 1992 et 2005, passant de 1,2 % à 3,8 %. Rappelons que plus d'un usager sur deux fréquentant l'espace festif « électro » est âgé de moins de 24 ans et que 62 % d'entre eux ont expérimenté la cocaïne. Ce phénomène n'est pas spécifique à l'espace festif techno mais touche de plus en plus des milieux jusque-là plutôt épargnés (*Observatoire Français des Drogues et des Toxicomanies, 2010*).

1.3. Pharmacocinétique

La quantité disponible dans le corps, l'amplitude et la durée du pic plasmatique dépendent de la voie d'entrée (*Haddah and Winchester, 1990*) :

- Par voie orale (ingestion), la cocaïne apparaît au niveau sanguin au bout de 30 min et le pic est obtenu en 50 à 90 min (*Clarke, 1986*).
- Par voie nasale, les effets débutent 3 min après la prise, le pic étant obtenu en 15 min environ.
- Par voie intraveineuse, le pic du taux sanguin est obtenu en quelques dizaines de sec et l'effet est de courte durée (20 min).
- Par inhalation (fumée sous forme de crack), les effets sur le cerveau apparaissent très rapidement après 8 à 12 sec, ils sont très violents (« flash ») et de très courte durée : 5 à 10 min (*Clarke, 1986*).

1.4. Catabolisme

La demi-vie de la cocaïne se situe entre 40 et 90 min, en fonction à la fois de la voie d'entrée, de la dose administrée et du sujet lui-même. La majeure partie de la cocaïne est métabolisée dans le foie, dans les 2 h suivant la prise. Trois voies de biotransformation ont été décrites (Figure 5 ; *Fleming et al., 1990*) :

- Une voie principale : les estérases hépatiques et plasmatiques hydrolysent la cocaïne pour former l'ester de méthylecgonine.
- Une voie secondaire : l'hydrolyse spontanée, probablement sans intervention enzymatique, conduit par déméthylation à la benzoylecgonine.

La forme de dégradation finale, conjonction des deux voies, est représentée par l'ecgonine.

- Une voie mineure : la N-déméthylation de la cocaïne aboutit à la norcocaïne.

La *benzoylecgonine*, et l'*ester de méthylecgonine* sont inactifs, alors que la *norcocaïne* est toujours active, En présence d'alcool se forme, par transestérification, un autre métabolite actif, le *cocaéthylène*, plus toxique encore que la cocaïne (*Jatlow et al., 1991*).

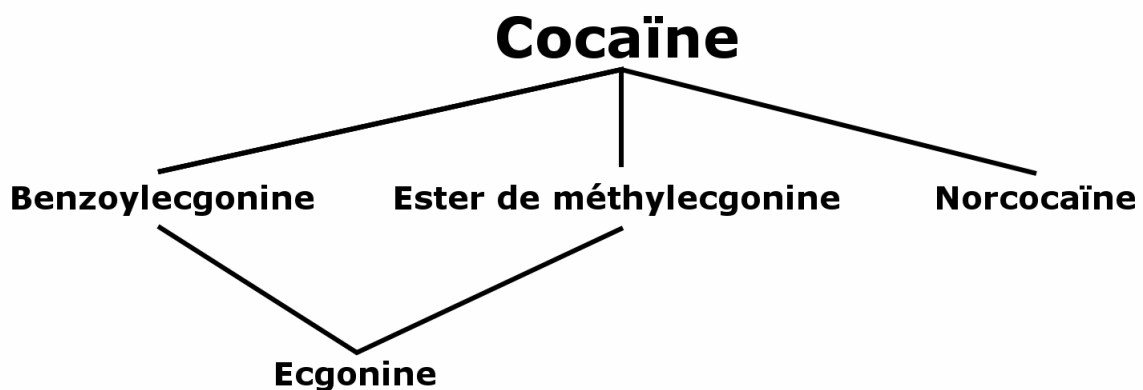


Figure 5 : **Catabolisme de la cocaïne**

Contrairement à la benzoylecgonine et à l'ester de méthylecgonine, la norcocaïne est un métabolite de la cocaïne toujours actif

L'élimination urinaire des métabolites se fait en proportions variables selon la voie d'entrée (*Ambre et al., 1988*). Au bout de 4 h, la majeure partie de la drogue est éliminée du plasma, mais les métabolites peuvent être identifiés jusqu'à 144 h après la prise. L'élimination se fait également dans les selles. La cocaïne et la benzoylecgonine sont retrouvées dans le lait maternel jusqu'à 36 h après la prise et dans les urines des nouveau-nés pendant cinq jours. Vu que les cheveux et les ongles gardent une trace des produits consommés au moment où ils poussent, les métabolites de la cocaïne peuvent y être détectés après de longues périodes, alors même que les analyses de sang et d'urine ne permettent plus d'obtenir des résultats exploitables.

1.5. Effets somatiques

La consommation de cocaïne n'affecte pas uniquement le fonctionnement du système nerveux central (SNC), mais induit de multiples manifestations somatiques. D'une façon générale, la consommation de cocaïne se traduit par une tachycardie, une hypertension artérielle, une dilatation pupillaire, accompagnées de sueurs, de frissons, de nausées ou de vomissements. Cela parce qu'elle agit directement sur les organes périphériques : systèmes cardiovasculaire, respiratoire, hépatique, rénal, immunitaire et les muscles striés squelettiques.

1.5.1. Manifestations neurologiques

L'usage de la cocaïne peut provoquer une désynchronisation de l'activité électrique du cerveau. Comme la cocaïne abaisse le seuil épileptogène, des convulsions sont fréquentes et peuvent survenir même après une administration unique. D'autres signes sont notés: céphalée, ischémie cérébrale ou hémorragie cérébro-méningée. Une hyperthermie est fréquemment décrite chez les usagers de « crack ». L'usage compulsif et chronique de cocaïne est associé à des perturbations diverses : des accidents cérébro-vasculaires (*Lichtenfeld et al., 1984; Wojak and Flamm, 1987*), des perturbations de la circulation sanguine cérébrale (*Volkow et al., 1992*), voire une atrophie cérébrale diffuse (*Pascual-Leone et al., 1991*). Ataxie, troubles de l'expression verbale et de la mémorisation semblent être très fréquemment retrouvés chez ces consommateurs (*Ardila et al., 1991*).

1.5.2. Activité anesthésique locale

La cocaïne est connue pour inhiber les canaux sodiques dépendant du voltage de façon rapidement réversible (*Crumb and Clarkson, 1990*). La cocaïne pénètre à l'intérieur du canal sodique et empêche l'influx de sodium dans les cellules dites « excitables » (cellules musculaires et nerveuses). Cette capacité d'inhibition a d'ailleurs conduit à l'utilisation de la cocaïne et surtout d'un de ses dérivés, la lidocaïne, dans l'anesthésie locale, pour leur action sur les fibres nociceptives A δ et C.

1.5.3. Toxicité cardio-vasculaire

La cocaïne, via l'activation du système nerveux autonome sympathique, induit une augmentation des taux plasmatiques d'adrénaline et de noradrénaline ayant pour conséquence l'augmentation du rythme cardiaque, voire l'apparition d'arythmies pouvant engendrer une ischémie myocardique (*Chakko, 2002*). La cocaïne provoque également une très forte

vasoconstriction des vaisseaux sanguins pouvant engendrer une rhabdomyolyse (Welch et al., 1991), mais aussi induire des nécroses dans certains tissus, notamment au niveau de la cloison nasale et des coronaires, d'où la fréquente survenue d'infarctus.

1.5.4. Toxicité pulmonaire

L'exposition à la cocaïne se traduit par des toux, des expectorations sanglantes, des douleurs thoraciques, des dyspnées, des pneumothorax et des hémorragies alvéolaires le tout sur fond d'hypertension artériopulmonaire (Perper and Van Thiel, 1992). Ces signes apparaissent de façon bien plus précoce et fréquente chez les usagers de crack. Un oedème du poumon peut accompagner l'intoxication aigüe, avec dans les cas les plus fulgurants, un décès en quelques heures (Gold, 1992).

1.5.5. Autres effets toxiques

Bien que nombre d'usagers vantent les propriétés aphrodisiaques de la cocaïne, son usage peut perturber les fonctions sexuelles. D'une façon schématique, une utilisation ponctuelle tend à augmenter la libido et les capacités sexuelles, alors qu'un usage compulsif entraîne des dysfonctionnements de type impuissance ou anorgasmie. L'injection intraveineuse de la drogue ou même l'inhalation de crack peut entraîner une éjaculation spontanée. Mais une tolérance se développe très rapidement, aboutissant à un état d'impuissance ou de frigidité (Cocores et al., 1988; Gold, 1992).

Puisque la cocaïne traverse la barrière placentaire, que sa demi-vie est plus longue chez le fœtus que chez la mère et qu'elle diminue le débit sanguin utérin, l'abus maternel de cocaïne pendant la grossesse est associé à une proportion importante d'avortements spontanés et de naissances prématurées. A la naissance, on observe une diminution du poids, de la taille, et du diamètre crânien du nouveau-né, ainsi que des dommages, souvent irréversibles, au niveau des fonctions cérébrales et motrices (Behnke and Eyles, 1993; Chiriboga, 1998).

1.6. Effets comportementaux

1.6.1. Administration aiguë

Chez l'homme, l'exposition unique à la cocaïne conduit à des effets comparables quelque soit le mode d'administration, ce dernier ne jouant que sur les délais, la durée et l'amplitude des phénomènes. Lors d'un usage occasionnel de cocaïne, le sujet devient euphorique et ressent un accroissement de la vigilance, une sensation subjective d'amélioration des performances

physiques et de l'acuité mentale, une diminution de la sensation de fatigue, de l'appétit et du sommeil. Cette phase dite de « rush » ou de « flash », est de type orgasmique. Ces aspects hédoniques font de la cocaïne un puissant renforçant positif. Si les administrations se succèdent sur une période brève, leur arrêt se traduit tout d'abord par une très forte fatigue et une lassitude. Puis s'ensuit une phase dite de « crash » durant laquelle le sujet ressent de l'anxiété, de la dépression, l'incitant à reprendre le produit.

1.6.2. Administration chronique

L'effet renforçant, ressenti lors des premières prises, motive fréquemment l'individu à une consommation ultérieure. Chez certains individus, cette phase de consommation contrôlée peut être suivie d'une phase dite phase d'« abus ». L'abus correspond à une consommation excessive induisant des dommages somatiques, psychoaffectifs ou sociaux soit pour le sujet lui-même, soit pour son environnement.

Durant les intoxications, les hallucinations visuelles, auditives, olfactives et cutanées se généralisent. Surviennent aussi des épisodes de délires d'interprétation revêtant une forme paranoïde. On rapporte de fréquentes attaques de panique, notamment chez les usagers de crack. Certains individus développeront un comportement vis-à-vis de la cocaïne caractérisé par une consommation compulsive, indépendante de leur propre volonté ; l'état de dépendance apparaît alors. Le potentiel de dépendance à l'égard de la cocaïne inhalée ou injectée est bien supérieur à celui de la cocaïne administrée par voie orale. Cela s'explique sans doute par l'exceptionnelle rapidité avec laquelle la cocaïne, une fois inhalée ou injectée, gagne le cerveau et y agit.

1.7. Facteurs de vulnérabilité

Divers paramètres peuvent être considérés comme des facteurs de vulnérabilité et ainsi prédisposer un individu à développer, au cours de sa vie, une dépendance vis-à-vis d'une drogue. Citons d'abord les facteurs liés à la sensibilité du consommateur comme ceux d'origine génétique. En effet, on sait entre autre que la présence de certains allèles du gène codant le récepteur au cannabinoïde CB1 augmente la probabilité de développer une dépendance à l'alcool (*Comings et al., 1997*). De même la présence d'un allèle particulier du gène du *BDNF* (« brain derived neurotrophic factor ») augmente la vulnérabilité au tabagisme (*Lang et al., 2007*).

D'autres facteurs liés à la sensibilité du consommateur sont l'âge, la propension à rechercher des sensations nouvelles, l'état émotionnel (hyperréactivité, stress, anxiété, dépression) et mental (faible estime de soi) ou encore la présence de troubles psychiatriques : psychoses (schizophrénie), troubles de la personnalité (antisocial, borderline), troubles de l'humeur (bipolarité), troubles de l'attention (hyperactivité associée à un déficit attentionnel). Pour ne prendre qu'un exemple, il est clairement démontré que la prévalence de l'abus de drogue, surtout de nicotine, était très élevée chez les patients atteints de schizophrénie, et qu'ils avaient un plus fort taux de rechute après sevrage (Potvin *et al.*, 2003).

En plus des facteurs liés à la personnalité, il existe aussi de nombreux facteurs liés à l'environnement dans lequel vit l'individu. Par exemple, une vie précaire en marge de la société ou l'absence de soutien familial augmentent la probabilité d'essayer diverses drogues, principalement l'alcool. La tolérance de l'environnement familial ou son dysfonctionnement, de même que le rôle de l'entourage (rites d'initiation, appartenance à un groupe) sont autant de facteurs d'entrée dans la consommation de drogues. Cette dernière peut-être vue comme une échappatoire à la suite d'évènements de vie traumatisants (abus sexuel, rupture conjugale, licenciement, deuil). Finalement, des facteurs liés à la drogue elle-même doivent être pris en considération, comme le pouvoir renforçant (très fort pour la cocaïne), la qualité, la pureté, la toxicité, ou encore le prix et la disponibilité.

Par opposition à ces facteurs de vulnérabilité, il existerait des facteurs dits de protection dont les principaux sont sans doute le soutien familial ou social et le sentiment d'appartenance à un groupe, à une communauté.

1.8. La dépendance aux drogues

1.8.1. Diagnostic

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

Le passage de l'usage simple à l'usage abusif, ou de l'usage abusif à la dépendance, n'est souvent pas perçu par le consommateur qui pense ou prétend maîtriser sa consommation. Cette impression d'« autocontrôle » n'est bien souvent qu'une illusion.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.8.2. Théories de la dépendance

Actuellement au moins cinq théories ont été proposées pour tenter d'expliquer la transition entre consommation contrôlée d'une drogue et dépendance (*Robinson and Berridge, 2003*).

1.8.2.1. Renforcement positif et négatif

Cette théorie, la plus intuitive *à priori*, est basée sur le fait que la consommation de drogue serait motivée d'une part par la recherche des effets euphorisants que procure la drogue (*Wise, 1996*) et d'autre part par l'évitement des effets négatifs rencontrés lors du sevrage (*Koob and Bloom, 1988*). Cependant ce modèle peut difficilement expliquer le caractère compulsif et récurrent de la dépendance, qui de plus s'accompagne souvent d'une diminution des effets euphorisants de la drogue après un usage répété.

1.8.2.2. *Processus opposants*

Cette théorie est basée sur le postulat que dans l'organisme, toute modification d'un état est contré par des processus au sein du SNC ayant pour but de diminuer l'intensité de cet état (Figure 6a ; *Solomon and Corbit, 1974*). Comme la théorie précédente, la théorie des processus opposants est basée sur le fait que la drogue est dans un premier temps consommée pour l'euphorie, puis pour éviter les symptômes de sevrage. En effet, la consommation de drogue produirait initialement un effet plaisant suite à l'activation du système de récompense (processus « a »). Le processus a induirait alors un effet opposant négatif qui viserait à rétablir l'homéostasie hédonique (processus « b »). La somme des processus « a + b » représenterait alors l'état ressenti. A chaque exposition à la drogue, le processus « a » resterait identique voire diminuerait en amplitude, alors que le processus « b » apparaîtrait progressivement et serait susceptible de s'amplifier et de durer de plus en plus longtemps au fur et à mesure de la répétition des prises. L'état de dépendance résulterait donc de la mise en place, dans le SNC, de nombreuses neuroadaptations persistantes qui s'opposeraient aux effets de la consommation d'une drogue. Ces adaptations aboutiraient à une totale dérégulation de l'homéostasie hédonique qui déboucherait sur l'apparition de la dépendance.

1.8.2.3. *Dérégulation de l'homéostatique / allostasie*

Basée sur la théorie précédente, la théorie de la dérégulation de l'homéostasie, encore appelée allostasie (the homeostatic dysregulation theory / allostasis ; *Koob and Le Moal, 1997*) représente le développement de la dépendance sous la forme d'un cercle vicieux et propose une hypothèse neurochimique des processus opposants (*Koob and Le Moal, 2008*). Le renforcement positif serait causé par l'activation du système de récompense, alors que le renforcement négatif serait causé par l'activation des voies neurochimiques du stress induisant surtout la libération de corticolibérine (*Koob, 2008*). La transition de l'impulsivité à vouloir consommer de la drogue vers une consommation compulsive serait liée à une perturbation des systèmes de récompenses et de stress : au fil des prises de cocaïne, la libération de dopamine (DA) diminue, provoquant un renforcement positif plus faible et la libération de corticolibérine augmente, provoquant un renforcement négatif plus fort. Ainsi, en accord avec les propositions de Solomon et Corbit, l'effet plaisant de la drogue diminue en durée et en intensité, alors que l'état de mal-être augmente ce qui aboutit à une homéostasie non stable (*Koob and Le Moal, 2008*) : c'est ce qu'on appelle l'allostasie (Figure 6b).

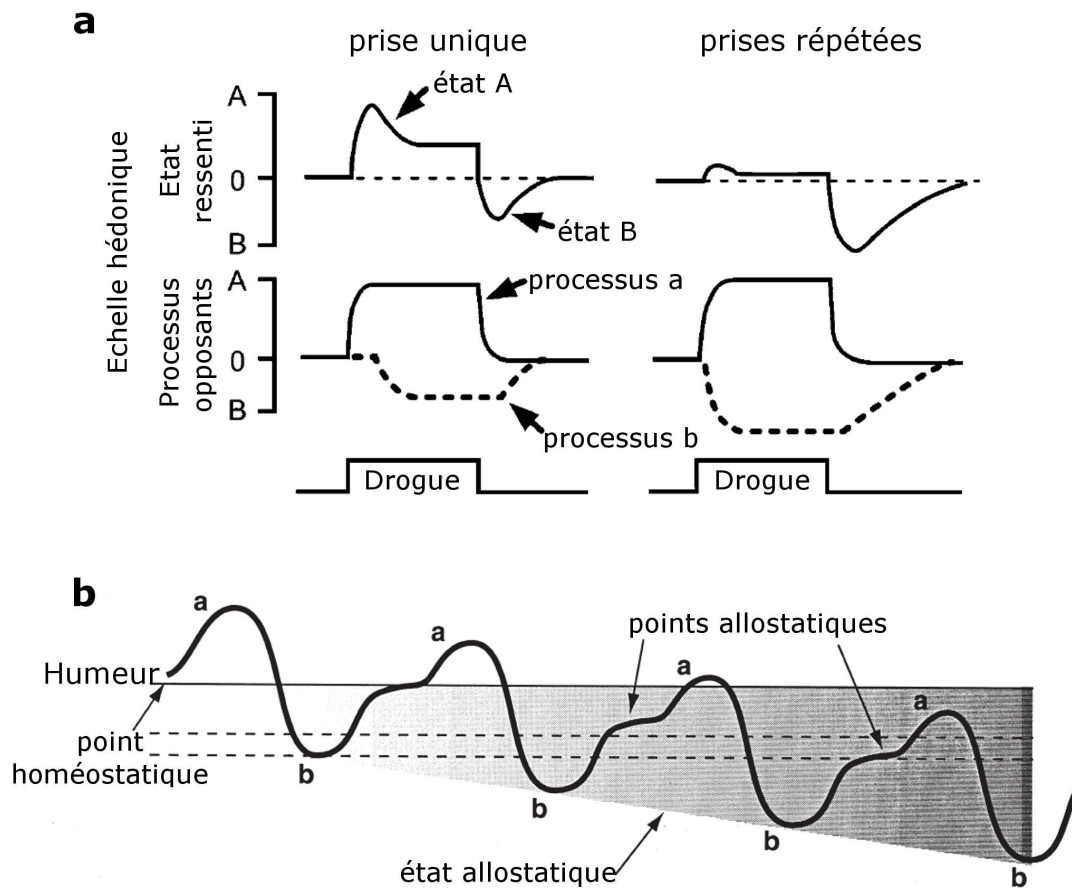


Figure 6 : **Théories de la dépendance**

Selon la théorie des processus opposants (a), la réponse hédonique à la drogue est le processus a, qui à son tour induit le processus opposant b. La somme de ces deux processus procure l'état initial plaisant A suivi d'un état déplaisant B. Lors d'une consommation contrôlée de drogue, l'état A est très important, alors que l'état B est très faible. Cependant, lors du développement d'une dépendance, le processus déplaisant b augmente d'amplitude et de durée, induisant un état B extrêmement anhédonique et prenant le dessus sur l'état A ; c'est le sevrage (adapté de *Solomon and Corbit, 1974*). Selon la théorie de l'allostasie (b), le processus b n'a jamais la possibilité de retourner à son état homéostatique originel avant que l'individu ne consomme à nouveau de la drogue. Cela a pour conséquence l'apparition d'un état allostatique de plus en plus anhédonique (adapté de *Koob and Le Moal, 2001*).

1.8.2.4. Apprentissage procédural aberrant

Cette théorie est basée sur le postulat que les drogues perturbent les mécanismes d'apprentissage et de mémorisation, qui servent habituellement à automatiser les comportements de survie (*Hyman et al., 2006*). Deux systèmes permettant de prédire la valeur d'une action sont présents dans le cerveau : un système planifié, qui permet d'effectuer une analyse bénéfique / risque d'un comportement projeté et un système automatique permettant d'associer une action spécifique à une situation donnée. Dans l'état initial, la consommation de drogue est consciente et dépendrait du système planifié. Puis au fur et à mesure du

développement de la dépendance, une transition s'opèrerait vers le système automatique. La drogue serait alors consommée par « mauvaise habitude » lors de l'exposition à des indices associés à la consommation (*Robbins and Everitt, 1999*). La transition d'une décision planifiée vers un comportement automatique serait corrélée au niveau neuroanatomique par un changement progressif des connections dopaminergiques. En particulier, le contrôle exercé par le cortex préfrontal (CPF) lors d'une décision planifiée serait remplacé par un contrôle exercé par le caudé-putamen (CPu) lors de la réponse automatique (*Everitt and Robbins, 2005*).

1.8.2.5. Sensibilisation de l'incitation / de la motivation

La théorie de la sensibilisation de la motivation (« incentive sensitization » ; *Robinson and Berridge, 1993*), repose sur la dissociation entre la valeur hédonique (« liking ») que procure la drogue et la recherche de la drogue (valeur motivationnelle ; « wanting »). On retrouve effectivement cette dichotomie au niveau neuroanatomique, vu que ces deux notions sont contrôlées par des réseaux neuronaux distincts. Selon cette théorie, le développement de la dépendance s'accompagnerait d'une sensibilisation du réseau neuronal contrôlant la valeur motivationnelle attribuée aux drogues et aux stimuli environnementaux associés. Le système dopaminergique serait nécessaire à la sensibilisation de la motivation, mais pas à l'attribution de la valeur hédonique (*Berridge and Robinson, 1998*). Cette sensibilisation de la motivation provoquerait donc chez le consommateur régulier un désir irrépressible de rechercher et de consommer la drogue, appelé « craving » (terme anglais faisant référence au « désir ardent, appétit insatiable », qu'il ressent ou non des symptômes de sevrage. Une fois en place, cette sensibilisation peut provoquer une recherche compulsive de drogue durant toute la vie. A ce propos, chez l'animal, la sensibilisation comportementale modélise très bien cette théorie. Ce paradigme est de plus dépendant du contexte étant fortement modulé par l'environnement dans lequel la drogue est administrée (*Tirelli and Terry, 1998*).

1.9. Sevrage et rechute

La prise de conscience des effets de la consommation de cocaïne sur l'organisme, sur la vie professionnelle, sociale et familiale ou encore l'urgence médicale peuvent conduire l'utilisateur régulier à tenter de mettre fin à sa consommation de drogue. Apparaît alors un syndrome de sevrage. Il arrive fréquemment que même après de très longues périodes de sevrage,

l'individu reprenne une consommation régulière et durable, comme s'il n'avait jamais cessé de consommer. On parle alors de rechute.

Il existe de nombreux facteurs pouvant induire la reprise de la consommation. Une forte sensation de manque, aboutissant à un besoin compulsif et un désir incontrôlable de reprise de la consommation ou « craving », est un facteur essentiel. Un second facteur déclenchant très important est le stress intense engendré par un évènement de vie qui peut induire le désir incontrôlable de reprise de la consommation. Le simple fait d'une réexposition à la drogue peut suffire dans certains cas pour reprendre une consommation régulière. Enfin, le fait de se retrouver dans le contexte environnemental dans lequel l'individu avait l'habitude de s'administrer la drogue ou encore la simple vue des instruments jadis utilisés pour son administration, sont suffisants pour réinstaller une consommation.

1.10. Thérapies existantes et nouvelles

Il n'existe, pour l'instant, aucun traitement pharmacologique de la dépendance aux psychostimulants. La prise en charge des patients, usagers chroniques de cocaïne, doit répondre à une multitude de facteurs qui sous-tendent cet usage et trouver des solutions adaptées aux problèmes médicaux, biologiques, psychologiques et sociaux. Du point de vue pharmacologique, on distinguera les traitements du sevrage des traitements de fond.

1.10.1. Traitements du sevrage

Il n'existe pas de traitement spécifique pour le sevrage à la cocaïne qui s'accompagne souvent de troubles de l'humeur. Ce sont essentiellement les manifestations cliniques du sevrage qui sont traitées avec des médicaments adaptés aux tableaux cliniques.

Les benzodiazépines restent les médicaments de référence pour la prise en charge des crises d'anxiété rencontrées lors du sevrage. L'utilisation des antidépresseurs est également justifiée, par leur action sur les neurotransmetteurs sérotonine (5-HT) et noradrénaline qui leur confèrent une utilité dans le traitement des états dépressifs.

1.10.2. Traitements de fond

La prescription des traitements médicamenteux employés lors du sevrage peut devenir, à des doses moindres et en fonction des effets résiduels, une prescription de moyenne ou longue durée. Il n'existe cependant aucune pharmacothérapie efficace, en comparaison des traitements de substitution des opiacés, pour la dépendance à la cocaïne.

A ce jour, aucun résultat concluant sur l'efficacité des antagonistes des récepteurs dopaminergiques dans le traitement de la dépendance n'a été rapporté. Néanmoins, l'utilisation d'antagonistes des récepteurs D₁ atténuerait le renforcement induit par la cocaïne. Des études cliniques sur des antagonistes agissant principalement sur les récepteurs D₂, comme les neuroleptiques classiques, ont montré qu'ils bloquaient partiellement la consommation de la cocaïne. Mais cette approche thérapeutique souffre de deux principaux problèmes :

- L'administration chronique de tels agents induit des effets moteurs extrapyramidaux indésirables.
- Le traitement répété d'antagonistes dopaminergiques peut conduire à une augmentation de la sensibilité des récepteurs dopaminergiques postsynaptiques, qui pourrait indirectement augmenter les effets subjectifs de la cocaïne et donc ses effets abusifs.

Des antagonistes D₃ ont été testés également, mais en raison de résultats contradictoires, des études ultérieures sont requises afin d'attribuer à ces récepteurs un rôle dans le traitement de la dépendance aux drogues (*Vorel et al., 2002*).

Dans une perspective similaire à celle utilisée dans le traitement de l'addiction aux opiacés par la méthadone, divers psychostimulants ont été proposés comme thérapie de substitution. Ces études ont montré que les symptômes de sevrage étaient diminués, mais que la consommation de cocaïne n'était pas réduite. De plus, à long terme, la consommation et l'état de manque augmentent (*Grabowski et al., 2001*). En conclusion, les essais cliniques et les approches thérapeutiques utilisant des agents facilitant la transmission dopaminergique pour le traitement de la cocaïne s'avèrent peu efficaces dans la réduction de l'utilisation de la drogue et la diminution des symptômes associés comme le « craving ».

La thérapie via des agonistes GABA_B comme le baclofène a montré son efficacité dans les essais cliniques en réduisant le renforcement induit par la drogue et en diminuant le « craving » (*Ling et al., 1998*). L'activation tonique du récepteur n'est donc pas requise pour ces effets renforçants puisqu'il a été montré que les antagonistes n'altèrent pas l'auto-administration (AA). De plus, des inhibiteurs des récepteurs GABA_A, comme la tiagabine, ont montré une diminution de la prise de cocaïne. Enfin, malgré le fait que certains agonistes du récepteur GABA_A, tels les benzodiazépines ou l'éthanol, montrent des propriétés appétitives, le topiramate montrerait lui une éventuelle efficacité pour diminuer le « craving » (*Reis et al., 2008*).

Enfin, plusieurs laboratoires pharmaceutiques travaillent à la mise au point d'un vaccin contre la cocaïne qui agirait en diminuant la quantité de cocaïne atteignant le SNC. Les travaux en cours semblent prometteurs bien qu'un tel vaccin ne sera pas administré de manière préventive à l'ensemble de la population, mais plutôt aux personnes souffrants d'une réelle dépendance aux drogues (*Kosten et al., 2002*)

1.10.3. Psychothérapie comportementale

Les approches psychothérapeutiques de la dépendance à la cocaïne s'inscrivent comme une condition importante pour la réussite du sevrage et surtout du maintien de l'abstinence. Il s'agit de psychothérapies de soutien, de psychothérapies d'inspiration analytique et des psychothérapies cognitivo-comportementalistes. Le soutien familial est aussi un facteur primordial dans la reconstruction de la personnalité et dans le maintien d'une abstinence à long terme.

2. Neurotransmetteurs impliqués dans les effets de la cocaïne

2.1. Le circuit de récompense

Depuis la découverte fondamentale par Olds et Milner en 1954, décrivant le circuit de récompense et de renforcement positif à partir d'auto-stimulations électriques dans le cerveau de rat (*Olds and Milner, 1954*), de nombreuses recherches ont montré l'implication de ces circuits dans les effets renforçants des drogues. Les substances ayant un pouvoir renforçant activent le circuit de récompense, provoquant le « rush » recherché par le consommateur (*Killam et al., 1957*). A la suite de ces résultats, de multiples recherches ont été réalisées pour cartographier le circuit, puis dans un deuxième temps, pour déterminer quels étaient les neurotransmetteurs impliqués. Ce circuit de récompense est constitué d'un ensemble de voies neuronales jouant un rôle clé dans la perception de la valeur appétitive des renforcements positifs, dans l'intégration de stimuli environnementaux prédictifs d'une récompense et dans leur traduction en une réponse motrice adaptée à sa recherche. Toutes les drogues agissent sur ce circuit via différents systèmes de neurotransmetteurs (Tableau 3).

Tableau 3 : Effets des drogues sur le système de récompense

Drogue	Site d'action principal sur le système de récompense
Alcool	Au niveau de la VTA, il inhibe les récepteurs NDMA et augmentent l'efficacité des récepteurs GABA _A .
Amphétamines Méthamphétamine	Au niveau du CPF, du CPu et du NAc, elles bloquent le VMAT ₂ situé dans les terminaisons nerveuses et bloquent le DAT situé sur les terminaisons des neurones DA issus de la VTA. Augmente la libération de DA.
Barbituriques Benzodiazépines	Au niveau de la VTA ils augmentent l'efficacité des récepteurs GABA _A inhibiteurs situés sur les terminaisons des interneurons GABA inhibiteurs.
Cannabis (Δ9-THC)	Au niveau de la VTA, il active les récepteurs CB1 inhibiteurs situés sur les terminaisons des neurones GABA inhibiteurs et glutamate excitateurs.
Cocaïne	Au niveau du CPF, du CPu et du NAc, elle bloque le DAT situé sur les terminaisons des neurones DA issus de la VTA.
Nicotine	Au niveau de la VTA, elle active les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine : les α4β2 activateurs situés sur les terminaisons des interneurons GABA inhibiteurs et les α7 activateurs situés sur les terminaisons glutamate excitatrices issues des régions corticales.
Opiacés	Au niveau de la VTA, ils activent les récepteurs μ inhibiteurs situés sur les terminaisons des interneurons GABA inhibiteurs.

CPF, cortex préfrontal ; CPu, caudé-putamen ; DA, dopamine ; DAT, transporteur de la dopamine ; GABA, acide γ-amino-butérique ; NAc, noyau accumbens ; VMAT₂, transporteurs vésiculaires des monoamines 2 ; VTA, aire tegmentale ventrale

2.2. Le système dopaminergique

Dans le SNC, la DA est impliquée dans le contrôle de multiples fonctions, telles l'activité locomotrice, le comportement alimentaire, la thermorégulation, les fonctions sexuelles, l'homéostasie cardio-vasculaire, les régulations endocrines, les fonctions cognitives (mémoire, attention) ainsi que dans les processus motivationnels, et c'est à ce titre qu'elle est considérée ici. Parmi les pathologies dont l'étiologie est directement liée à un dysfonctionnement de la neurotransmission dopaminergique, la maladie de Parkinson est la mieux caractérisée. Elle est la conséquence de la dégénérescence de la voie nigro-striée (*Greer and Williams, 1963*).

2.2.1. Synapse dopaminergique

2.2.1.1. Métabolisme de la dopamine

L'essentiel de la synthèse de la DA se déroule au niveau des terminaisons nerveuses catécholaminergiques. La DA est synthétisée à partir de l'acide aminé Tyr en deux étapes (Figure 7). La première étape est la conversion de la L-tyrosine en L-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA) par la tyrosine hydroxylase et la seconde étape est la conversion de la L-DOPA en DA par la L-DOPA décarboxylase.

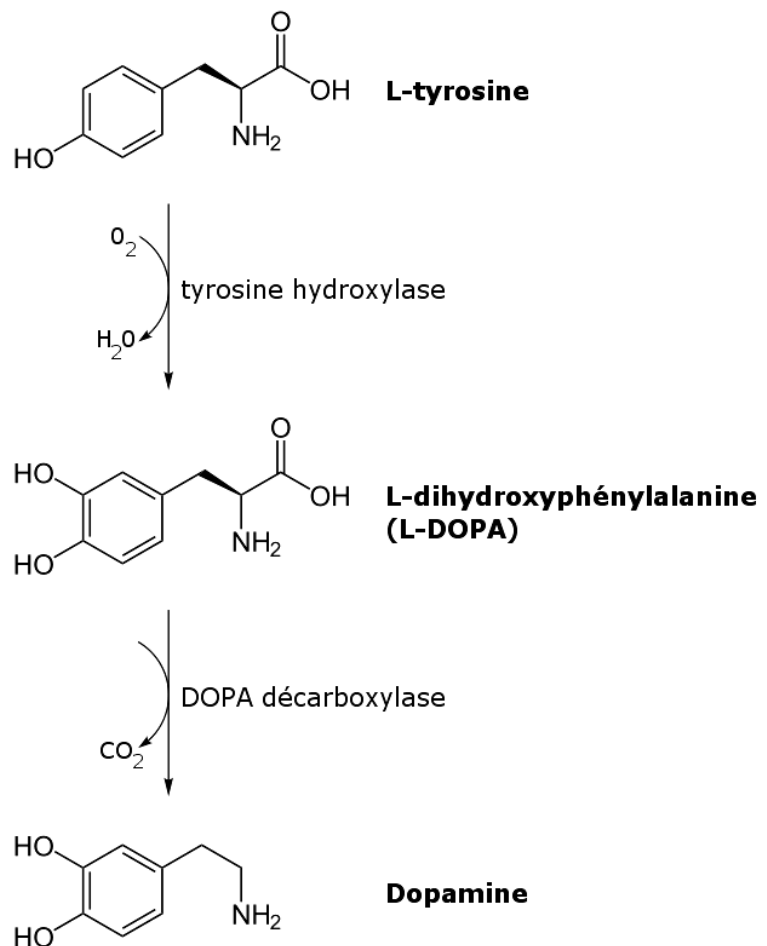


Figure 7 : **Biosynthèse de la DA**
Celle-ci s'effectue en deux étapes à partir de l'acide aminé L-tyrosine. La tyrosine hydroxylase est l'enzyme limitante dans cette biosynthèse

La DA néosynthétisée dans le cytosol est stockée dans des vésicules synaptiques au niveau des terminaisons axonales à l'aide de transporteurs vésiculaires des monoamines-2 (VMAT₂). La libération par exocytose de la DA est dépendante du calcium et est déclenchée par l'arrivée de potentiels d'action. La quantité de DA libérée dépend de l'activité électrique du neurone, les décharges en bouffées entraînant la plus forte libération de DA. Une fois libérée, la DA stimule des récepteurs pré- et post-synaptiques. L'inactivation de la DA extracellulaire se fait par des mécanismes de recapture par l'élément présynaptique, par l'intermédiaire d'un transporteur de la dopamine (DAT). Cette recapture représente le principal processus d'inactivation et de recyclage de l'amine (environ 80%). Une fois dans le cytosol, la DA est soit dégradée, soit restockée dans les vésicules via VMAT₂. La dégradation de la DA s'effectue par les enzymes catéchol-O-méthyl-transférase et monoamine oxydase (Figure 8). L'action successive, dans un ordre variable de ces deux enzymes, aboutit à la formation d'acide homovanillique.

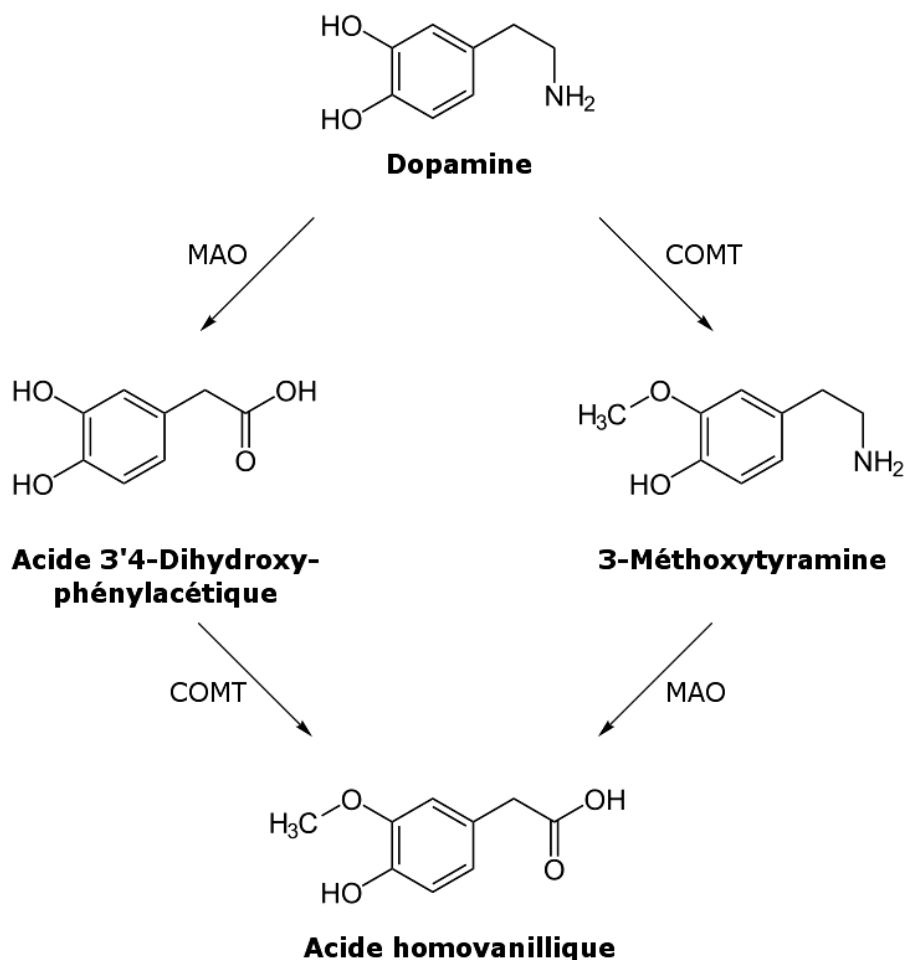


Figure 8 : **Catabolisme de la DA**

L'action successive, dans un ordre variable de la catéchol-O-méthyl-transférase (COMT) et de la monoamine oxydase (MAO) aboutit à la formation d'acide homovanillique

2.2.1.2. Régulation de la tyrosine hydroxylase

La biosynthèse de la DA est surtout contrôlée au niveau de l'activité de l'enzyme de synthèse tyrosine hydroxylase, qui est formée d'un tétramère de sous-unités identiques de masse moléculaire d'environ 60 kDa. Chacune des sous-unités possède un domaine catalytique du côté C-terminal de l'enzyme et un domaine régulateur du côté N-terminal. La partie régulatrice est la cible de différentes protéine kinases, qui phosphorylent les résidus Ser en position 19, 31, 40 et 153, induisant une augmentation de l'activité enzymatique (*Jedynak et al., 2002*).

La tyrosine hydroxylase est régulée par de multiples facteurs. La DA cytosolique exerce un rétrocontrôle négatif sur l'activité de la tyrosine hydroxylase. La DA extracellulaire exerce une influence inhibitrice par le biais des récepteurs D₂ (*Onali and Olanas, 1989*). Lors de modifications à long terme de l'activité des neurones dopaminergiques, on observe une régulation de la transcription de l'enzyme (*Molinoff and Axelrod, 1971*). En effet, une augmentation prolongée de l'activité des neurones dopaminergiques provoque une induction de l'ARNm de la tyrosine hydroxylase (*Best et al., 1995*).

2.2.1.3. Les transporteurs

Il existe deux types de transporteurs de la DA. Les transporteurs vésiculaires VMAT concentrent la DA du cytosol vers les vésicules synaptiques et le transporteur membranaire DAT capte la DA libérée dans la fente synaptique.

Deux VMAT distincts ont été caractérisés, le VMAT₁ et le VMAT₂ ; ce dernier étant le transporteur neuronal qui possède une forte affinité pour la DA. Ces protéines sont constituées de douze segments transmembranaires et comportent une longue boucle intravésiculaire entre le premier et le deuxième segment transmembranaire. Le transport de la DA du cytoplasme vers l'intérieur des vésicules est couplé à une sortie protons (*Liu and Edwards, 1997*). Il est à noter que ces transporteurs ne sont pas spécifiques de la DA, mais permettent aussi de stocker la 5-HT, la noradrénaline et l'histamine.

Le DAT a été cloné chez le rat (*Kilty et al., 1991*) et il est très conservé entre les espèces. Il appartient à la famille des transporteurs dépendant du sodium et du chlore. Cette protéine de 619 acides aminés est organisée également en douze segments transmembranaires, comportant une longue boucle extracellulaire entre le troisième et le quatrième segment transmembranaire. Les parties N- et C-terminales sont situées dans le cytoplasme. La partie N-terminale jusqu'au cinquième segment transmembranaire est responsable du passage de la

DA, des ions et des autres substrats. La partie centrale représente le site de fixation des antidépresseurs tricycliques et de la cocaïne (Buck and Amara, 1994). La cocaïne, en se liant au DAT, bloque son activité (Figure 9). Il s'en suit une rapide et importante accumulation de DA dans la fente synaptique et surtout dans l'espace pérисynaptique, mesurée notamment chez le rat par des études de microdialyse, dans le CPF, le CPu, le noyau accumbens (NAc), la substance noire ou l'aire tegmentale ventrale (VTA) (Di Chiara and Imperato, 1988; Maisonneuve et al., 1990). La cocaïne joue ainsi un rôle d'agoniste dopaminergique indirect. En plus de bloquer le DAT, la cocaïne inhibe le transporteur membranaire de la 5-HT, pour lequel elle présente une affinité beaucoup plus importante, et le transporteur membranaire de la noradrénaline (Ritz et al., 1990).

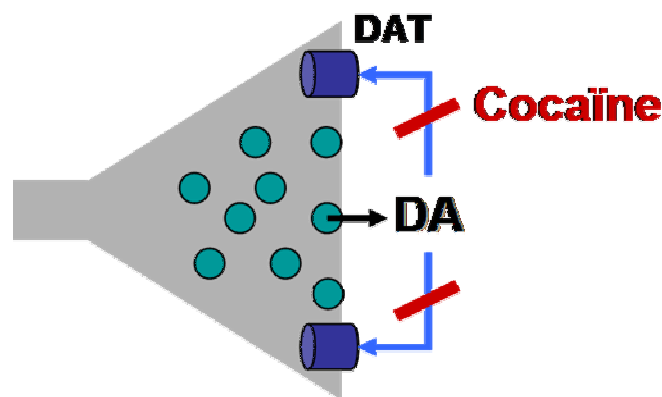


Figure 9 : **Mécanismes d'action de la cocaïne**

La cocaïne bloque la recapture de la DA, de la 5-HT et de la noradrénaline en se fixant sur les transporteurs membranaires spécifiques à chaque monoamine.

Le DAT possède de plus des sites de glycosylation et de nombreux sites de phosphorylation, par les protéines kinases A, C ou Ca^{2+} /calmodulines kinases (Ca^{2+} /CaM kinases ; Foster et al., 2006). L'entrée du substrat dans la cellule est couplée au cotransport de deux ions sodium et d'un ion chlore (Sonders et al., 1997). La sélectivité du DAT pour la DA est très importante par rapport aux autres catécholamines (Kitayama et al., 1992), mais il est aussi responsable de l'entrée des neurotoxines 6-OHDA et MPTP dans les neurones dopaminergiques (Piffl et al., 1993). Selon un mécanisme de régulation compensatoire, les neurones augmentent l'expression du DAT à la surface de leurs membranes en réponse à des administrations répétées de cocaïne, ce qui contribue sans doute à la diminution des concentrations de DA extracellulaires observées à l'arrêt de la drogue (Parsons et al., 1991). L'effet inhibiteur de la cocaïne sur le DAT a été démontré chez l'homme par tomographie par émission de positons, puisqu'on constate une très forte corrélation entre le degré d'occupation du DAT par la cocaïne et le « rush » ressenti chez le sujet (Volkow et al., 1997).

2.2.1.4. Les récepteurs

Cinq sous-types de récepteurs dopaminergiques, codés par des gènes distincts, ont été clonés (*Bunzow et al., 1988; Dearry et al., 1990; Sokoloff et al., 1990; Sunahara et al., 1991; Van Tol et al., 1991*). Ils appartiennent à la superfamille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Ils peuvent être regroupés en deux familles :

Les récepteurs de la famille D₁, dont la partie codante des gènes ne possède pas d'introns susceptibles de produire des variants par épissage alternatif, sont les récepteurs D₁ et D₅. Les récepteurs D₁ sont les plus représentés dans les structures cérébrales et le plus intensément exprimés parmi tous les sous-types (*Fremeau et al., 1991; Weiner et al., 1991*). L'ARNm du récepteur D₁ est localisé dans les aires de projection des neurones dopaminergiques comme le bulbe olfactif, le CPu, le NAc, mais aussi dans l'hypothalamus et le thalamus. Dans le CPu, le récepteur D₁ est préférentiellement localisé sur les neurones GABAergiques coexprimant la substance P (*Le Moine and Gaspar, 1998*). Comparé au récepteur D₁, le récepteur D₅ est peu exprimé dans le SNC de rat et présente une distribution différente. En effet, il est majoritairement localisé dans l'hippocampe et les noyaux thalamiques, où le récepteur D₁ n'est que peu détecté.

Les récepteurs de la famille D₂, dont la partie codante des gènes possède des introns susceptibles de produire des variants par épissage alternatif, sont les récepteurs D₂, D₃ et D₄. La DA présente environ vingt fois plus d'affinité pour les récepteurs D₃ et D₄ que pour le D₂. La région codante du gène du récepteur D₂ possède six introns (*Monisma et al., 1989*), celle du récepteur D₃ en possède cinq (*Sokoloff et al., 1990*) et celle du récepteur D₄ en possède trois (*Van Tol et al., 1991*). Les récepteurs de la famille D₂ sont présents essentiellement dans le NAc, le CPu, le CPF, l'hypothalamus, la substance noire et la VTA (*Bouthenet et al., 1991*). Dans le CPu, ils sont présents sur les neurones GABAergiques épineux de taille moyenne coexprimant les enképhalines (*Le Moine and Gaspar, 1998*). Le récepteur D₃ est exprimé surtout dans le NAc, les tubercules olfactifs, la substance noire ou la VTA, l'hippocampe et le cervelet, mais son expression est très faible dans le CPu (*Sokoloff et al., 1990; Bouthenet et al., 1991*). Enfin le récepteur D₄ se retrouve surtout dans le CPF, le CPu, l'amygdale, le cervelet et l'hippocampe (*Van Tol et al., 1991*). Les récepteurs D₂ et D₃ semblent jouer un rôle important dans la régulation de la transmission dopaminergique par rétrocontrôle négatif. En effet, la DA peut inhiber sa propre libération en se fixant sur les autorécepteurs D₂ et / ou D₃ présents au niveau des terminaisons dopaminergiques (*Kreiss et al., 1995; Gobert et al., 1996*).

Les récepteurs de la famille D₁ sont localisés sur les neurones postsynaptiques, alors que les récepteurs de la famille D₂ ont une localisation à la fois pré- et post-synaptique. Par contre la question de la colocalisation des récepteurs D₁ et D₂ dans un même neurone a longtemps été controversée. En effet, l'ARNm du récepteur D₁ est détecté dans les neurones à substance P de la voie striato-nigrale, alors que celui du récepteur D₂ est présent dans les neurones à enképhalines de la voie striato-pallidale (*Le Moine and Gaspar, 1998*). Dans le striatum ventral, les récepteurs D₁ et D₃ sont également présents dans un même neurone (*Le Moine and Bloch, 1995*). Ainsi, en général, un même neurone exprimerait les récepteurs D₁ et D₃/D₄ ou les récepteurs D₂ et D₅.

2.2.1.4.1. Transduction du signal

Les récepteurs de la DA sont tous des récepteurs métabotropes à sept segments transmembranaires couplés à une protéine G. La partie N-terminale possède un nombre similaire d'acides aminés dans tous les sous-types de récepteurs. Par contre, on trouve des différences dans le nombre de sites de N-glycosylation. La partie C-terminale est environ sept fois plus grande chez les récepteurs de la famille D₁ que chez ceux de la famille D₂. Cette région est riche en résidus Ser et Thr, des sites potentiels de phosphorylation, et contient un résidu Cys qui est conservé dans tous les récepteurs couplés aux protéines G (*Jaber et al., 1996*).

Les récepteurs de la famille D₁ sont couplés à une protéine G_s qui active une adénylate cyclase (*Kebabian et al., 1984*) catalysant la synthèse d'AMP cyclique. Par contre, ceux de la famille D₂ sont couplés à une protéine G_{i/o} inhibant cette adénylate cyclase (*Cooper et al., 1986*). Les récepteurs de la famille D₁ sont parfois couplés à une protéine G_q et induisent la production d'inositol-triphosphate par l'intermédiaire de la phospholipase C (*Undie and Friedman, 1990*). Les récepteurs de la DA présentent des actions antagonistes sur l'entrée du calcium dans les neurones ; la famille D₁ provoque son entrée (*Lin et al., 1995*), alors que la famille D₂ inhibe son entrée, mais augmente son stockage dans le réticulum endoplasmique (*Malgaroli et al., 1987*). L'activation du récepteur D₁ inhibe la pompe Na⁺,K⁺-ATPases, alors que la stimulation du récepteur D₂ l'active (*Horiuchi et al., 1993*). L'augmentation de la DA dans la synapse induit la diminution de la concentration d'AMP cyclique et l'inhibition de la protéine kinase A dans l'élément présynaptique aboutissant à un accroissement de l'activité du DAT (*Batchelor and Schenk, 1998*) ; la DA stimule donc sa propre recapture. D'autres mécanismes de régulation de l'activité du DAT par phosphorylation ont été décrits : la phosphorylation par la protéine kinase C du DAT réduit son activité (*Zhu et al., 1997*), alors

que la phosphorylation par la Ca^{2+} /CaM kinase II l'augmente (Pierce and Kalivas, 1997). En résumé, les récepteurs de type D_1 sont généralement associés à une augmentation de l'activité des neurones cibles tandis que la stimulation des récepteurs de type D_2 induit une diminution de l'excitabilité des neurones (Seamans and Yang, 2004).

2.2.1.4.2. Auto-administration et dopamine

S'il est évident que le système dopaminergique joue un rôle essentiel dans le mode d'action de la cocaïne, les effets de la cocaïne proviennent de l'action simultanée du neurotransmetteur sur plusieurs types de récepteurs DA. Parmi les données concernant l'interaction entre la cocaïne et les ligands dopaminergiques, ceux concernant l'AA de cocaïne montrent que :

- Les agonistes D_1 ne maintiennent pas le comportement d'AA initié par la cocaïne et déplacent la courbe dose-réponse vers la droite, ce qui représente une diminution des propriétés de récompense de la drogue (Caine et al., 2000). La préadministration d'antagonistes D_1 réduit le comportement d'AA chez le rat (Bergman et al., 1990).
- Les agonistes D_2 maintiennent l'AA initiée par la cocaïne et déplacent la courbe dose-réponse vers des doses plus faibles, suggérant une potentialisation des effets renforçants de la cocaïne (Caine et al., 2000). Les antagonistes D_2 peuvent réduire l'AA chez le rat et déplacer la courbe dose-réponse vers la droite (Caine and Koob, 1994).

2.2.2. Anatomie des voies dopaminergiques

Les neurones dopaminergiques du SNC ont été localisés par des expériences d'histofluorescence, ce qui a permis de dénombrer neuf noyaux (A8 à A16 ; Anden et al., 1965). Ces noyaux font partie de systèmes anatomiques distincts. Cette distinction a été faite dans l'annotation des voies dopaminergiques en fonction de la taille des projections :

Les systèmes de projection à neurones très courts comprennent :

- les neurones présents dans la rétine et dans le bulbe olfactif : il s'agit de cellules périglomérulaires qui lient les cellules mitrales aux glomérules adjacents.

Les systèmes de projections à neurones courts comprennent :

- La voie tubéro-infundibulaire, dont les corps cellulaires se trouvent dans les noyaux arqué et périventriculaire de l'hypothalamus ; elle projette vers l'éminence médiane, la tige et le lobe intermédiaire de l'hypophyse et vers la posthypophyse.
- La voie périventriculaire, dont les corps cellulaires sont situés dans le pont, le mésencéphale et le diencéphale ; elle projette vers l'hypothalamus, l'habénula et les noyaux du raphé.

Les systèmes de projection à neurones longs comprennent (Figure 10 ; *Haber and Fudge, 1997*) :

- La voie nigro-striée, dont les corps cellulaires se trouvent dans la partie compacte de la substance noire (aire A9) ; elle projette vers le CPu et le NAc core (NAcC). Les dendrites issues de ces corps cellulaires s'arborescent dans la partie réticulée de la substance noire (aire A9). Cette voie est principalement impliquée dans l'initiation et le contrôle de la motricité extrapyramidale.
- La voie méso-cortico-limbique, dont les corps cellulaires sont situés dans la VTA (aire A10) et qui projette, d'une part dans le NAc shell (NAcS), l'amygdale et le complexe septo-hippocampique, formant la voie méso-limbique, et d'autre part dans le CPF, le cortex cingulaire antérieur (CgCx) et les cortex piriforme et entorhinal, formant la voie méso-corticale. Cette voie est principalement impliquée dans les processus motivationnels ; elle fait partie du « circuit de récompense ».

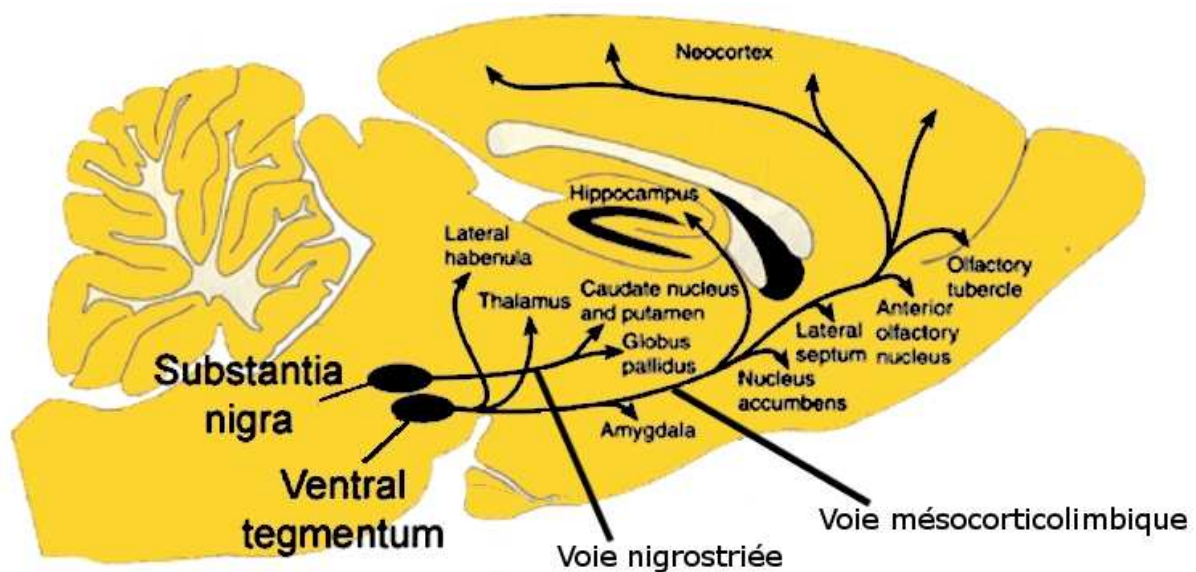


Figure 10 : **Les voies dopaminergiques de projection longue**

Schéma représentant les deux systèmes de projection à neurones longs du système dopaminergique chez le rat.

Concernant les structures cibles des neurones à projections longues, le CPU contient comme cellules principales des neurones épineux de projection de taille moyenne, représentant 90% de l'ensemble des neurones de cette structure. Ce sont des neurones GABAergiques qui contiennent et libèrent également divers neuropeptides tels les enképhalines, la dynorphine, la substance P, la neurotensine ou la neurokinine B (*Kanazawa et al., 1977; Sar et al., 1978; Vincent et al., 1982; Delle Donne et al., 1997*). Les 10% de neurones restant sont des interneurones non épineux GABAergiques et des interneurones cholinergiques géants (*Pickel and Chan, 1990*).

Le NAc peut être divisé en deux compartiments : la partie core du NAc est proche du CPU et est principalement impliquée dans les mécanismes d'initiation des mouvements, la partie shell du NAc est plutôt limbique et participe davantage au contrôle des processus émotionnels et attentionnels (*Meredith, 1999*). Le NAc forme ainsi une interface entre les systèmes moteurs et limbiques (*Mogenson et al., 1980*). La division anatomique entre core et shell permet de clarifier le rôle du NAc dans les fonctions motivationnelles, telles que le comportement moteur et appétitif (*Robbins and Everitt, 1996*). Le NAc est innervé principalement par des neurones dopaminergiques, colibérant la cholécystokinine, issus de la VTA et de la substance noire compacte (*Lanca et al., 1998*), mais également par des afférences glutamatergiques issues du CPF, de l'hippocampe et de l'amygdale. Le NAcC envoie ses projections GABAergiques principalement vers la substance noire compacte et réticulée, alors que le NAcS projette essentiellement sur la VTA et le thalamus (*Ikemoto, 2007*). Les deux sous-régions projettent également sur le pallidum ventral.

2.2.3. Rôle de la dopamine dans les processus de récompense

L'administration aiguë de cocaïne induit une hyperdopaminergie extracellulaire et l'administration répétée n'est pas associée à un phénomène de tolérance : au fil du temps, la cocaïne induit une libération de plus en plus importante de DA dans le NAc ou le CPU. Cette sensibilisation neurochimique a été proposée comme étant responsable de la sensibilisation comportementale. Durant la période d'abstinence ou de sevrage de la cocaïne, la concentration de DA dans le CPU et le NAc diminue, pour atteindre des valeurs inférieures aux taux de base, ce qui pourrait participer à l'état anhédonique observé durant cette phase. Il semble donc que les modifications des taux de DA extracellulaires lors de la phase de sevrage et après réadministration de cocaïne soient en adéquation avec l'état hédonique de l'animal. Enfin, l'excès de DA observé au niveau des structures cibles des voies dopaminergiques suite

à l'exposition répétée à la cocaïne n'induit pas de régulation homéostasique, mais plutôt un phénomène d'allostasie participant à ce qu'on pourrait qualifier de fuite en avant du système dopaminergique face à la drogue et donc de l'individu face à sa consommation.

Plusieurs hypothèses ont été proposées quant au rôle de la DA dans les processus de récompense (*Berridge, 2007*). La plus ancienne, aujourd'hui très largement remise en question voire réfutée, suggérait que le système dopaminergique méso-cortico-limbique sustentait la composante hédonique ou le « plaisir » associé à la récompense. Elle reposait sur le fait que ce système est activé par la plupart des récompenses naturelles et par toutes les drogues (*Wise and Bozarth, 1985; Di Chiara and Imperato, 1988*).

Selon une autre hypothèse, la DA serait plutôt impliquée dans des processus d'activation sensorimotrice. De fait, de nombreuses données indiquent que la DA joue un rôle dans la genèse de l'action, l'effort, le mouvement, l'attention ou encore l'éveil (*Salamone et al., 1994*). Ainsi, chez le rat, de faibles doses d'antagonistes dopaminergiques entraînent un changement de stratégie, l'animal préférant les tâches faciles et faiblement récompensées aux tâches fortement récompensées, mais qui demandent un plus grand effort (*Salamone and Correa, 2002*). Cette hypothèse est toutefois très générale et ne permet pas d'expliquer les aspects plus spécifiques de la récompense.

D'autres auteurs pensent que le système dopaminergique modulerait la saillance motivationnelle attribuée aux drogues et aux stimuli associés. Cette hypothèse, qui n'est pas en contradiction avec la précédente, repose notamment sur des travaux selon lesquels la DA est impliquée dans l'envie de drogue (« wanting ») plutôt que dans ses effets hédoniques (« liking ») (*Berridge and Robinson, 1998*). Selon cette hypothèse, la DA attribuerait une valeur ajoutée d'ordre émotionnelle aux stimuli associés à la prise de drogue.

Certains auteurs suggèrent que le système dopaminergique serait plutôt impliqué dans l'apprentissage et la prédiction de l'occurrence de la récompense. Cette hypothèse repose sur le fait qu'après apprentissage, les neurones dopaminergiques s'activent lors de la présentation des stimuli qui annoncent la récompense, plutôt que lors de l'arrivée de la récompense elle-même (*Schultz, 2000*).

2.3. Le système sérotoninergique

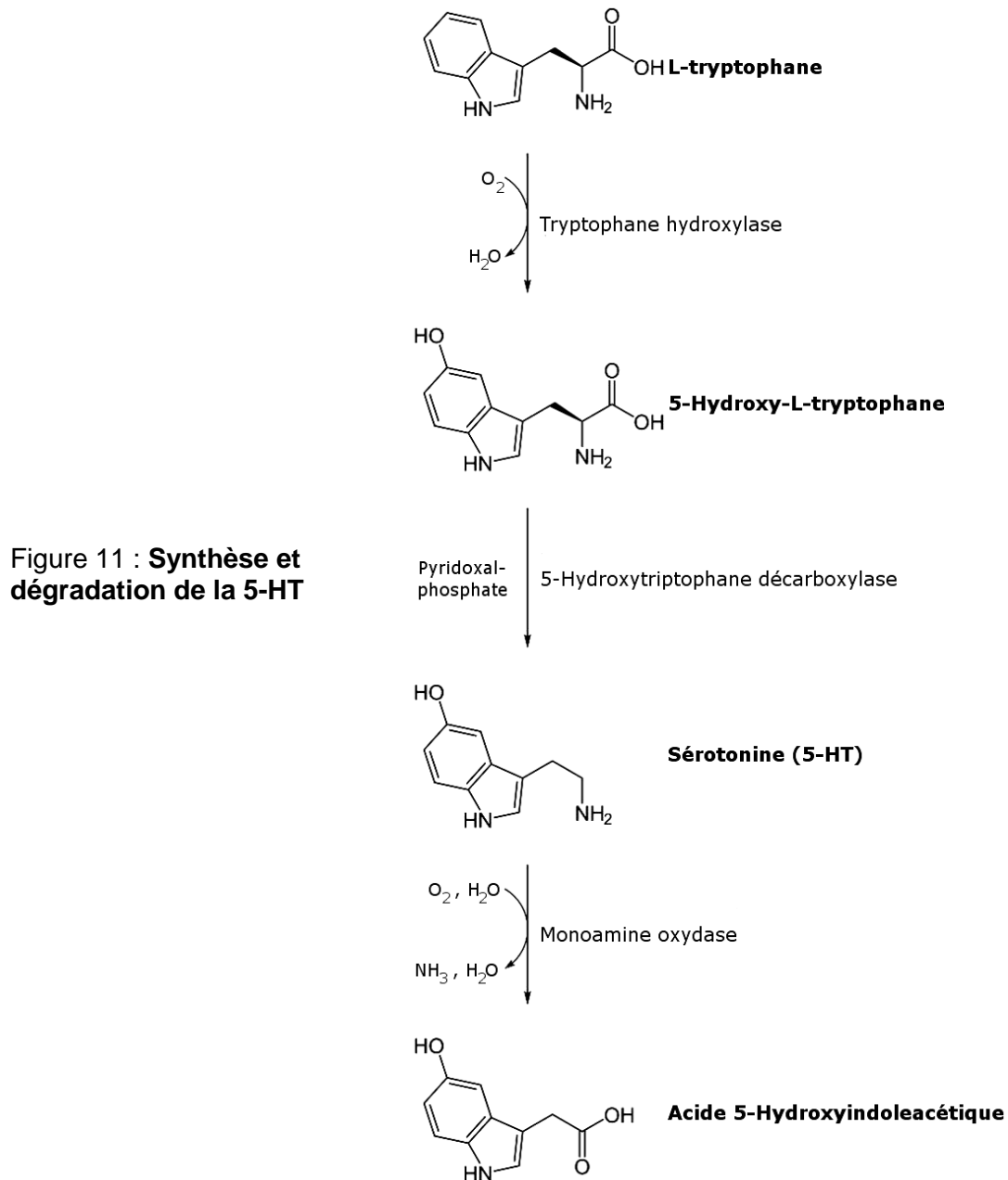
L'implication de la neurotransmission sérotoninergique centrale dans les addictions a été établie par de nombreuses études précliniques et cliniques au cours des dernières années. La cocaïne est capable de fixer et d'inhiber le transporteur membranaire de la 5-HT de façon plus

efficace que pour le DAT (*Ritz et al., 1990*). Il s'ensuit une augmentation de la concentration synaptique de 5-HT qui pourrait participer à la sensation d'euphorie. S'il est aujourd'hui accepté que le système dopaminergique soit primordial dans les effets de la cocaïne dans le SNC, divers travaux suggèrent aussi l'implication de ce système de neurotransmission. Ainsi, les souris knock-out pour le DAT ou pour le transporteur membranaire de la 5-HT recherchent toujours le compartiment associé à la cocaïne dans le test de préférence de place conditionnée (CPP), mais ce comportement est éteint chez les souris doublement mutées pour le DAT et le transporteur membranaire de la 5-HT (*Sora et al., 1998; Sora et al., 2001*). Alors que des souris dont le gène codant le DAT a été invalidé continuent à s'auto-administrer de la cocaïne (*Rocha et al., 1998*), des travaux très récents ont montré que les souris invalidées pour le transporteur membranaire de la 5-HT, ne s'auto-administrent plus la drogue (*Thomsen et al., 2009*). Enfin, le système sérotoninergique module l'induction par la cocaïne de l'expression de certains gènes (*Humblot et al., 1998*).

2.3.1. Synapse sérotoninergique

2.3.1.1. Métabolisme de la sérotonine

La 5-HT, est un neurotransmetteur que l'on retrouve dans l'ensemble du SNC et qui stimule un grand nombre de récepteurs distincts, expliquant qu'il soit impliqué dans un grand nombre de fonctions. La 5-HT est synthétisée en deux étapes à partir du L-tryptophane, un acide aminé essentiel apporté par l'alimentation. Le L-tryptophane est hydroxylé dans les neurones sérotoninergiques en 5-hydroxytryptophane par l'isoforme II de la tryptophane-hydroxylase, qui représente l'enzyme limitante de la synthèse. La décarboxylase des acides aminés aromatiques transforme finalement le 5-hydroxytryptophane en 5-HT (Figure 11). La plus grosse partie de la 5-HT libérée est inactivée par un mécanisme de recapture assuré par le neurone présynaptique. Cette recapture fait intervenir le transporteur membranaire de la 5-HT, qui comme le DAT possède douze domaines transmembranaires et dépend d'un cotransport d'ions sodium et chlore. Une fois dans le cytosol, la 5-HT peut être dégradée en 5-hydroxyindolacétaldéhyde par la monoamine oxydase, une enzyme située sur la membrane externe des mitochondries. L'aldéhyde est ensuite oxydé en acide 5-hydroxyindole acétique, sous l'action d'une aldéhyde déshydrogénase.



2.3.1.2. Récepteurs sérotoninergiques

Les récepteurs de la 5-HT sont très nombreux (5-HT₁ à 5-HT₇ ainsi que tous les sous-types), mais peuvent être regroupés en deux familles (Filip *et al.*, 2005) :

- Les récepteurs couplés à des protéines G :
 - Les récepteurs 5-HT₁ (5-HT_{1A}, 1B, 1D, 1E, 1F) et 5-HT₅ (5-HT_{5A}, 5B), couplés aux protéines G_{i/o}, inhibent l'adénylate cyclase, stimulent l'ouverture d'un canal potassique et la fermeture d'un canal calcique (Peroutka, 1994; Nelson, 2004). Les récepteurs 5-HT₁ sont aussi couplés à l'activation de la voie des MAP kinases.

- Les récepteurs 5-HT₂ (5-HT_{2A}, 2B, 2C), couplés aux protéines G_q, activent la phospholipase C (*Pritchett et al., 1988*) ce qui résulte en la production d'inositol-triphosphate suivie de l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium (*Peroutka, 1994*).
- Les récepteurs 5-HT₄, 5-HT₆ et 5-HT₇, couplés aux protéines G_s, activent l'adénylate cyclase (*Costall and Naylor, 1993; Thomas and Hagan, 2004; Woolley et al., 2004*).
- Les récepteurs canaux :
 - Les récepteurs 5-HT₃ (5-HT_{3A}, 3B, 3C) sont couplés à un canal sodique dont la stimulation induit la dépolarisation des neurones (*Derkach et al., 1989*). La 5-HT, via ce récepteur présynaptique, module la libération de DA (*Blandina et al., 1988*), de GABA (*Alhaider et al., 1991*) ou encore de 5-HT (*Martin et al., 1992*).

Il est à noter qu'on observe un parallélisme entre les concentrations extracellulaires de DA et de 5-HT en réponse à la cocaïne : après une augmentation durant l'exposition à la drogue, on note une dépression de 5-HT sous les valeurs basales durant la phase de sevrage, ce qui participe vraisemblablement à l'explication de l'anhédonie ressentie lors de cette phase (*Parsons et al., 1996*). Parmi les nombreuses données concernant l'interaction entre la cocaïne et les ligands sérotoninergiques, on peut citer celles concernant l'AA de cocaïne, qui montrent que :

- Les agonistes 5-HT_{1A} diminuent l'AA de cocaïne, alors que les agonistes 5-HT_{1B} l'augmentent (*Peltier and Schenk, 1993; Parsons et al., 1998*).
- Les antagonistes 5-HT_{2A} n'empêchent pas l'installation du comportement d'AA, mais ne permettent pas à la cocaïne de réactiver ce comportement après une période de sevrage (*Fletcher et al., 2002*).
- Les antagonistes 5-HT_{2C} augmentent l'AA de cocaïne, alors que les agonistes la diminuent (*Grottick et al., 2000; Fletcher et al., 2002*).

2.3.2. Voies sérotoninergiques

Les neurones qui synthétisent la 5-HT sont peu nombreux dans le SNC. Ils sont localisés, pour l'essentiel, au sein des noyaux mésencéphaliques et bulbaires du raphé, numérotés de B1 à B9 selon un axe rostro-caudal (*Anden et al., 1965*). Les expériences de marquage par transport axonal ont montré l'existence de nombreuses projections ascendantes et

descendantes provenant de ces noyaux. Le système descendant correspond aux neurones des quatre noyaux (B1 à B4), qui innervent la moelle épinière, alors que le système ascendant est constitué de neurones innervant le cerveau par deux faisceaux principaux (Figure 12 ; *Jacobs and Azmitia, 1992*) :

- Le faisceau dorsal, issu du noyau dorsal du raphé, innerve les cortex frontal, pariétal et occipital, le NAc, le CPU, la SN, la VTA, mais aussi l'amygdale, le cervelet et la partie ventrale de l'hippocampe.
- Le faisceau ventral, issu du noyau médian du raphé, innerve le NAc, mais aussi le thalamus, l'amygdale, l'hippocampe dorsal et le septum.

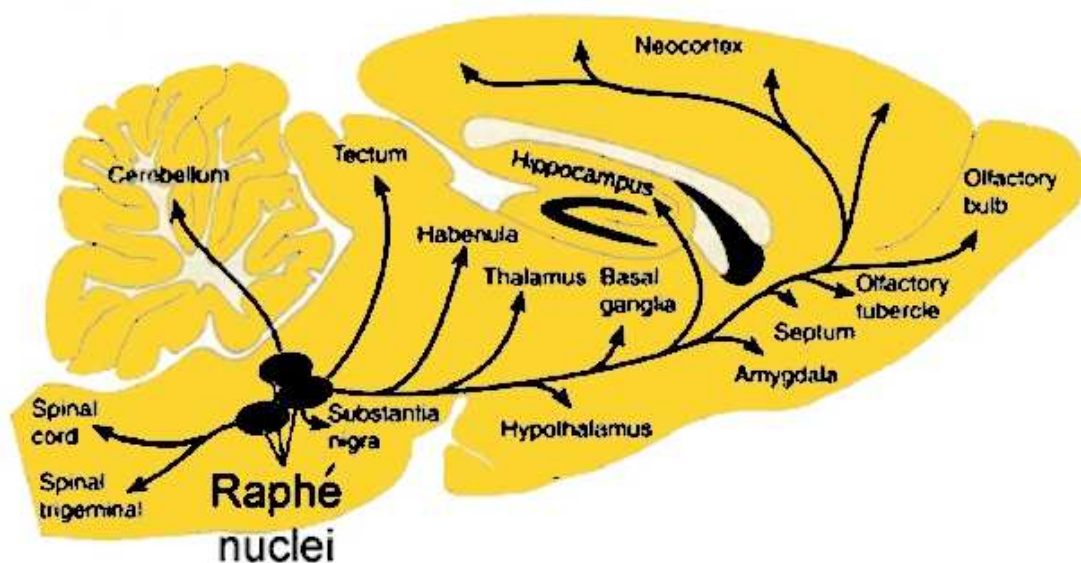


Figure 12 : **Voies sérotoninergiques**

Schéma représentant les systèmes de projection ascendants et descendants, issus des noyaux du raphé, du système sérotoninergique chez le rat.

2.4. Le système noradrénergique

En plus du DAT et du transporteur membranaire de la 5-HT, la cocaïne inhibe le fonctionnement du transporteur présynaptique de la noradrénaline, ce qui aboutit à une augmentation de la concentration extracellulaire de NA, notamment dans le CPF et le NAc (*Florin et al., 1994*). La noradrénaline intervient dans l'attention sélective, l'éveil et les réactions au stress (*Foote et al., 1983; Berridge and Waterhouse, 2003*). Elle est impliquée dans l'addiction, l'apprentissage et la mémoire, l'excitabilité neuronale, la douleur et les troubles affectifs (*Ressler and Nemeroff, 1999; Gibbs and Summers, 2002; Weinshenker and Schroeder, 2007*). Elle est synthétisée à partir de la DA dans les neurones noradrénergiques ; la DA est convertie en noradrénaline par la dopamine- β -hydroxylase. Une fois libérée, la

noradrénaline peut être dégradée par la catéchol-O-méthyl-transférase en normétanéphrine ou recapturée au niveau des terminaisons par le transporteur de la noradrénaline et dégradée en 3,4-dihydroxyphénylglycolaldéhyde par la monoamine oxydase.

Les récepteurs de la noradrénaline ont été divisés en deux catégories principales : α et β . On compte six sous-types α : $\alpha 1A$, $\alpha 1B$, $\alpha 1D$, $\alpha 2A$, $\alpha 2B$ et $\alpha 2C$, et trois sous-types β : $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 3$ (Levitzki, 1986; Ruffolo and Hieble, 1994). Ces récepteurs noradrénergiques sont tous des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Les familles $\alpha 1$, $\alpha 2$ et β sont respectivement couplées aux protéines G_q , $G_{i/o}$ et G_s (Summers and McMartin, 1993).

Le système noradrénergique comprend deux projections ascendantes composées des voies dorsale et ventrale. La voie dorsale est issue du *locus coeruleus*, un noyau mésencéphalique projetant sur le CPF, l'hippocampe et le cervelet. La voie ventrale prend son origine dans plusieurs noyaux du pont et de la medulla et innerve le thalamus, l'hypothalamus et l'amygdale (Moore and Bloom, 1979).

Diverses études ont montré l'implication du système noradrénergique dans la CPP et dans la sensibilisation locomotrice induites par la cocaïne ou encore l'AA de psychostimulants (Harris et al., 1996; Drouin et al., 2002). On sait aussi que des souris dépourvues de dopamine β -hydroxylase n'expriment pas de CPP pour la cocaïne alors qu'elles acquièrent une CPP pour la nourriture (Jasmin et al., 2006). La noradrénaline est donc nécessaire pour la perception par l'animal des effets plaisants des psychostimulants. Plus particulièrement, le récepteur $\alpha 1$ -adrénergique semble jouer un rôle important. Ainsi, la prazosine, antagoniste des récepteurs $\alpha 1$, inhibe la libération de DA dans le NAcC et bloque l'augmentation de l'activité locomotrice, toutes deux induites par l'amphétamine (Drouin et al., 2002). Elle s'oppose aussi à l'augmentation d'AA de cocaïne, suite à sa préexposition (Zhang and Kosten, 2007). Enfin, l'hyperactivité locomotrice et la sensibilisation comportementale induites par l'amphétamine et la cocaïne sont réduites chez des souris dont le gène du récepteur $\alpha 1B$ a été invalidé (Drouin et al., 2002). Ces résultats sont toutefois contradictoires avec des études plus anciennes qui avaient montré que la noradrénaline ne jouait qu'un rôle mineur dans les mécanismes cérébraux induits par la cocaïne, notamment dans ses effets renforçants (Roberts et al., 1977).

2.5. Interactions avec les autres systèmes de neurotransmetteurs

En plus des systèmes monoaminergiques, les systèmes GABAergique, glutamatergique, opioïde et cannabinoïdes jouent un rôle important dans les processus de dépendance.

2.5.1. Système GABAergique

Le GABA, neurotransmetteur inhibiteur, est omniprésent dans le SNC. On évalue à 30% la proportion des synapses du SNC dans lesquelles il intervient. Il est présent à des concentrations très élevées dans certaines régions du cerveau, notamment dans les ganglions de la base. Le GABA est formé dans les neurones au niveau des mitochondries par une décarboxylation du glutamate ; la réaction est catalysée par une décarboxylase de l'acide glutamique (*Olsen, 2002*).

Le GABA possède trois récepteurs dans le SNC. Deux sont des récepteurs ionotropes couplés à une conductance chlorure, ce sont les récepteurs GABA_A et GABA_C, et un récepteur métabotrope couplé à une protéine G : le récepteur GABA_B (*Macdonald and Olsen, 1994; Barnard et al., 1998*). Dans le SNC, le récepteur GABA_C est exprimé exclusivement dans la rétine (*Zhang et al., 1995*). Le récepteur GABA_A est formé d'un canal ionique qui s'ouvre après fixation du GABA sur ses sites, et permet un flux entrant d'ions chlorure qui hyperpolarisent le neurone. Le récepteur GABA_A possède une pharmacologie très riche, puisque les benzodiazépines, les barbituriques, les neurostéroïdes, l'alcool, des anesthésiques dont le propofol lient le récepteur sur des sites particuliers et modulent son fonctionnement.

Le récepteur GABA_B provoque une dépression synaptique et contribue à l'inhibition neuronale. Il est couplé à une protéine G_{i/o} et à divers systèmes d'effecteurs intracellulaires, comprenant l'inhibition des canaux calciques dépendant du voltage de type L et N, la stimulation de la phospholipase A2, l'inhibition de l'adénylate cyclase et l'activation de la phospholipase C (*Misgeld et al., 1995*). Il est présent sur les neurones dopaminergiques de la substance noire compacte et de la VTA (*Wirtshafter and Sheppard, 2001*). Au niveau de la substance noire réticulée, il a une localisation présynaptique, puisqu'il est colocalisé avec la parvalbumine, un marqueur des neurones GABAergiques (*Wirtshafter and Sheppard, 2001*).

Du fait de la présence de nombreux interneurons GABA dans les noyaux dopaminergiques ainsi que dans leurs régions cibles, de nombreuses études se sont penchées sur le rôle du GABA dans le mode d'action de la cocaïne. Ainsi, un traitement répété de cocaïne diminue les taux de GABA dans le CPu (*Jung et al., 1999*) et module l'expression des différents sous-types de récepteurs GABA_A (*Yamaguchi et al., 2000*) et GABA_B (*Li et al.,*

2003). A l'opposé, l'activation du système GABAergique diminue les concentrations de DA dans le CPU et le NAc. Le GABA a donc un effet inhibiteur sur l'hyperdopaminergie induite par la cocaïne. (Gruen *et al.*, 1992). Des agonistes GABA_A sont dotés de propriétés appétitives (Martellotta *et al.*, 1998), alors que des antagonistes sont aversifs (Acquas *et al.*, 1989). Certains modulateurs allostériques positifs, tels les benzodiazépines, sont également appétitifs (Spyraki *et al.*, 1985). Les benzodiazépines diminuent de façon globale l'AA de cocaïne (Goeders *et al.*, 1989) de même que le baclofène, un agoniste GABA_B (Roberts and Andrews, 1997).

En conclusion, en modulant la neurotransmission dopaminergique, le système GABAergique, au travers de son neurotransmetteur et de ses récepteurs, peut diminuer l'efficacité de la cocaïne.

2.5.2. Système glutamatergique

Le système glutamatergique est le plus répandu dans le SNC. Son neurotransmetteur, le glutamate, concerne environ 50% des synapses centrales et est responsable de la principale neurotransmission excitatrice dans le SNC des mammifères. Il participe aux modifications de l'efficacité de la transmission synaptique sous-tendant les mécanismes de la mémoire et de l'apprentissage et joue ainsi un rôle déterminant dans nombre de processus mentaux.

On distingue traditionnellement deux classes de récepteurs du glutamate, les métabotropes et les ionotropes. Ces derniers sont divisés en trois groupes : α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionate (AMPA), kainate et N-Méthyl-D-Aspartate (NMDA) (Nakanishi *et al.*, 1998). A ce jour, huit gènes ont été clonés codant des récepteurs métabotropes et quatorze codant des récepteurs ionotropes dans le SNC de mammifères. Quatre sous-unités ont été isolées formant le récepteur AMPA (mGluR1 à mGluR4), cinq constituant le récepteur kainate (mGluR5, mGluR6, mGluR7, KA1 et KA2) et cinq formant le récepteur NMDA (NR1, NR2A, NR2B, NR2C et NR2D). Les récepteurs NMDA fonctionnels sont des hétérodimères composés d'une sous-unité NR1 et d'une sous-unité NR2 ; il existe donc de multiples compositions de ce récepteur. La Gly est un coagoniste indispensable à l'activation du récepteur NMDA (Vyklícky *et al.*, 1990). Ce dernier est impliqué dans les mécanismes responsables de la plasticité synaptique, tels que la potentialisation à long terme ou la dépression à long terme, notamment dans l'hippocampe et le cortex (Bliss and Collingridge, 1993). L'activation du récepteur AMPA, est nécessaire à l'action du glutamate sur le récepteur NMDA (Desce *et al.*, 1992).

Les récepteurs métabotropes forment une superfamille de récepteurs couplés aux protéines G regroupés en trois groupes selon leur séquence (*Pin and Duvoisin, 1995*). Cette classification tient compte aussi des cascades de transduction auxquelles ils sont associés, et de leur pharmacologie respective. Le groupe I (mGluR1 et mGluR5) est couplé à l'activation de la phospholipase C, mais mGluR1 est aussi couplé positivement à l'adénylate cyclase (*Aramori and Nakanishi, 1992*). Les groupes II (mGluR2 et mGluR3) et III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 et mGluR8) sont couplés à une protéine G_i et donc négativement au système de l'adénylate cyclase (*Duvoisin et al., 1995*). Une des fonctions principales des récepteurs métabotropes est de réduire la transmission glutamatergique du neurone présynaptique. Par contre, de par leur localisation postsynaptique, ils jouent un rôle important dans la régulation de l'excitabilité neuronale et des conductances ioniques mises en jeu par les récepteurs ionotropes.

L'interaction DA / glutamate est considérée aujourd'hui comme capitale dans le mode d'action de la cocaïne, en particulier dans le phénomène de sensibilisation comportementale (*Kalivas et al., 1993*). Le traitement répété de cocaïne augmente les concentrations extracellulaires de glutamate dans l'hippocampe, le NAc, la substance noire compacte et la VTA (*Kalivas and Duffy, 1995; Smith et al., 1995*). L'administration répétée de cocaïne module aussi l'expression des différents sous-types de récepteurs (*Churchill et al., 1999; Ghasemzadeh et al., 1999*). De plus, les agonistes NMDA augmentent les propriétés renforçantes de la cocaïne et facilitent la rechute après une période d'abstinence (*Cornish et al., 1999*), alors que les antagonistes NMDA bloquent l'acquisition de l'AA de cocaïne (*Schenk et al., 1993*). Les récepteurs AMPA sont aussi impliqués dans les phénomènes de rechute (*Cornish and Kalivas, 2000*). Enfin, les antagonistes des récepteurs métabotropes semblent plutôt induire une diminution de l'AA de cocaïne (*McGeehan and Olive, 2003*).

A l'image du système GABAergique, il apparaît que le système glutamatergique joue un rôle essentiel dans les propriétés de la cocaïne, sans doute par la régulation de l'activité dopaminergique dans le NAc et la VTA.

2.5.3. Système opioïde

Le système opioïde joue essentiellement un rôle de neuromodulateur dans le SNC. Il est composé de trois familles de récepteurs aux opioïdes : delta (δ), kappa (κ) et mu (μ) (*Stefano et al., 2000*). Ce sont tous des récepteurs métabotropes couplés aux protéines $G_{i/o}$ diminuant l'activité neuronale, car inhibant l'adénylate cyclase, les canaux calciques dépendant du

voltage et activant les canaux potassiques. Il existe trois groupes de ligands endogènes de ces récepteurs (Goldstein et al., 1979; Grossman and Clement-Jones, 1983) : les dynorphines spécifiques des récepteurs κ , les endorphines plutôt sélectives des récepteurs μ et les enképhalines se fixant sur les δ et les μ . La morphine présente pour sa part une affinité plus forte pour les récepteurs μ (Stefano et al., 2000). Du fait du fort pouvoir addictif de la morphine ou de l'héroïne, le système opioïde semble très fortement impliqué dans les mécanismes neurobiologiques de la dépendance aux autres drogues. Par exemple, l'administration de cocaïne augmente la libération d'endorphines et réduit l'expression du gène codant le récepteur κ (Rosin et al., 1999; Olive et al., 2001). Le blocage des récepteurs opioïdes μ et κ par l'antagoniste naltrexone diminue l'AA de cocaïne chez le rat (Corrigall and Coen, 1991). Un autre antagoniste des récepteurs μ , la naloxone, induit une aversion de place et bloque la CPP induite par la cocaïne (Skoubis and Maidment, 2003). Par opposition, l'administration de l'agoniste des récepteurs μ , la buprénorphine, diminue le comportement d'AA (Mello et al., 1989).

Le système opioïde est lui aussi un médiateur important des effets comportementaux induits par la cocaïne.

2.5.4. Système cannabinoïde

Le système cannabinoïde a été découvert comme la cible de la principale molécule active du cannabis, le Δ^9 -THC. Tout comme le système opioïde, celui des cannabinoïdes joue essentiellement un rôle de neuromodulateur dans le SNC.

Deux récepteurs ont été isolés, les récepteurs CB1 et CB2 (Demuth and Molleman, 2006). Ce sont des récepteurs métabotropes couplés soit aux protéines G_s , activatrices de l'adénylate cyclase, soit aux protéines $G_{i/o}$, inhibitrices de l'adénylate cyclase. Un des ligands endogènes de ces deux récepteurs est l'anandamide (Devane et al., 1992). Concernant l'implication du système endocannabinoïde dans les effets renforçants des psychostimulants, le tableau est moins net. Chez le rat, le blocage des récepteurs CB1 s'oppose aux effets des psychostimulants. En effet, l'antagoniste rimonabant empêche l'acquisition du conditionnement de CPP induit par la cocaïne (Chaperon et al., 1998), et un autre antagoniste, l'AM-251, diminue l'AA de méthamphétamine (Vinklerova et al., 2002). L'activation des récepteurs CB1 semble également nécessaire à la réinstallation du comportement d'AA de cocaïne. Ainsi, le HU-210, agoniste cannabinoïde, réactive la recherche de cocaïne après extinction, tandis que le rimonabant atténue la rechute induite soit par les stimuli

antérieurement associés à la cocaïne, soit par l'exposition à une dose test de cocaïne (*De Vries et al., 2001; De Vries and Schoffemeer, 2005*). Cependant, certaines réponses comportementales aux psychostimulants ne sont pas modifiées chez les souris dont le gène *CBI* est invalidé ou chez des souris non mutées après blocage de ces récepteurs (*Maldonado et al., 2006*). Ainsi, le conditionnement de CPP et la sensibilisation comportementale induits par la cocaïne, ou l'AA de cocaïne ou d'amphétamine ne sont pas diminués chez ces souris (*Cossu et al., 2001; Lesscher et al., 2005*). Au contraire, d'autres études montrent que l'AA de cocaïne est diminuée chez des souris dont le gène *CBI* est invalidé ainsi que chez des souris non mutées ayant reçues du rimonabant (*Soria et al., 2005*). Les résultats concernant l'implication du système endocannabinoïde dans les effets renforçants des psychostimulants sont moins cohérents, mais aboutissent à la conclusion que ce système est capable de moduler les effets comportementaux de la cocaïne.

2.6. Cocaïne et expression génique

L'activation de l'ensemble des systèmes de neurotransmission impliqués dans la réponse aux drogues, et plus particulièrement à la cocaïne, est à l'origine d'un vaste ensemble de réponses physiologiques. En effet, la cocaïne modifie à court terme l'activité neuronale en modulant des courants ioniques ou des cascades de signalisations intracellulaires (*Nairn et al., 2004*). Bien que modifiée très rapidement après l'administration de cocaïne, l'expression de gènes se trouve altérée sur le long terme (*Moratalla et al., 1992*). Enfin à très long terme, la cocaïne change la morphologie des synapses, des épines dendritiques (*Robinson et al., 2001*) voire la morphologie des circuits neuronaux.

La mise en jeu des voies de l'AMP cyclique et des MAP kinases par la cocaïne aboutissent respectivement à l'activation de CREB (« cAMP responsive element binding protein ») ou de Elk-1 (*Hyman et al., 1995; Jenab et al., 2005*). Ces facteurs de transcription sont constitutifs dans la cellule et sont activés par phosphorylation (protéine kinase A / MAP kinase ERK). D'autres facteurs de transcription sont dit inductibles car présents en très faible quantité dans la cellule au repos et transcrits *de novo* à partir de gènes d'expression précoce, suite à l'activation de la cellule. Parmi ces gènes à réponse précoce, on trouve les isoformes de la protéine Fos et ceux de la protéine Jun. L'association, sous forme d'hétérodimère, d'une protéine Fos (c-Fos, Fra-1, Fra-2, FosB ou Δ fosB) avec une protéine Jun (c-Jun, JunB, JunD) forme le complexe de transcription AP-1 (*Morgan and Curran, 1991*). L'expression des protéines Fos et Jun peut être initiée par les facteurs de transcription constitutifs CREB ou

Elk, mais aussi via la Ca^{2+} /CaM kinase. Ce facteur de transcription est activé de façon si fréquente (apprentissage et mémoire, épilepsie, stress, consommation de drogues ; *Herrera and Robertson, 1996*), qu'il est désormais considéré comme un marqueur de l'activité neuronale. L'administration aiguë de cocaïne induit c-Fos et c-Jun dans le CPU et le NAc (*Graybiel et al., 1990*). Un autre gène précoce, *egr-1* est également induit par la cocaïne (*Humblot et al., 1998*). L'exposition chronique à la cocaïne conduit à un phénomène de tolérance aboutissant à une absence d'effet de la drogue sur l'expression de certains gènes à réponse précoce tel *c-Fos* (*Ennulat et al., 1994*) ou à des modifications de la cinétique de l'expression pour d'autres comme *egr-1* (*Jouvert et al., 2002*). Par contre, on observe l'accumulation d'autres gènes proches de *Fos*, les *Fras* chroniques, qui possèdent une demi-vie plus longue. (*Hope et al., 1994*). Un des *Fras* chroniques qui semble jouer un rôle dans les effets de la cocaïne est le gène *ΔfosB* (*Nestler, 2001*).

Des études par microarrays ont montré chez l'animal que l'expression d'un grand nombre de gènes est modifiée en réponse à la cocaïne (*Yao et al., 2004; Yufarov et al., 2005*). Des études faites sur des échantillons de cerveau humain ont montré que chez les consommateurs réguliers de cocaïne il y avait des niveaux d'expression différents pour certains gènes par rapport au sujet non toxicomanes (*Bannon et al., 2005; Lehrmann et al., 2006*).

L'ensemble de ces données démontre clairement que la cocaïne modifie l'expression des gènes. Elles permettent d'expliquer les modifications fonctionnelles et morphologiques qui ont lieu à plus long terme en réponse à la cocaïne.

3. Les modèles d'études comportementales des effets de la cocaïne

3.1. Activité locomotrice et sensibilisation comportementale

L'amphétamine, la cocaïne et la nicotine sont des psychostimulants qui, quand ils sont injectés de manière aiguë au rat, produisent des modifications mesurables de leur comportement : augmentation de la locomotion et de l'activité exploratoire pour des doses faibles et moyennes ; apparition de comportements stéréotypés pour de fortes doses (*Witkin and Goldberg, 1990*). En d'autres termes, à doses faibles et moyennes, les psychostimulants augmentent l'interaction du sujet avec son environnement. L'effet psychostimulant peut être détecté très facilement en plaçant le rat dans une boîte d'actimétrie quadrillée de faisceaux infrarouges. Le nombre de coupure des faisceaux permet de quantifier les effets locomoteurs de la drogue. D'autres études mettent en jeu un système d'enregistrement par caméra, permettant de calculer la distance totale parcourue. En plus de cette analyse quantitative, il est possible de mesurer plus spécifiquement l'activité exploratoire des animaux en les plaçant dans des cages dont les parois sont munies de trous ; le comportement exploratoire sera évalué en mesurant le nombre et la durée de l'exploration de ces trous. Les mouvements stéréotypés sont le plus souvent directement observés par l'expérimentateur : toilettage, reniflement, mouvement de la tête, redressement sur les pattes arrières.

Des modifications du milieu extérieur, survenant de façon répétée, peuvent être à l'origine de modifications à long terme du fonctionnement du SNC. Cette plasticité neuronale joue un rôle essentiel dans l'adaptation comportementale puisqu'elle permet à l'organisme de modifier son comportement en fonction des expériences passées. La sensibilisation comportementale induite par la cocaïne est un exemple de ces phénomènes d'adaptation. La sensibilisation comportementale est définie par l'augmentation d'une réponse à un stimulus, lors de l'exposition répétée à ce stimulus. Dans le cas qui nous intéresse, elle correspond plus particulièrement à l'augmentation de l'hyperactivité locomotrice notée lors de l'exposition répétée à une dose constante de cocaïne (Tableau 4 p50 ; *Kalivas et al., 1988; Pierce and Kalivas, 1997*). Ce phénomène persiste pendant plusieurs mois après la dernière injection. Il a été postulé que cette sensibilisation pouvait jouer un rôle important dans le développement de la toxicomanie vis-à-vis de ces drogues (*Robinson and Berridge, 1993*).

Un des aspects les plus intéressants de la sensibilisation est qu'une fois établie chez les animaux, ceux-ci développent un comportement d'AA même à de très faibles doses de drogue, inefficaces chez les témoins. Par ailleurs, ils manifestent cette vulnérabilité à très long terme. Le rôle de l'environnement où s'est fait la rencontre avec la drogue est fondamental,

puisque ce n'est que dans cet environnement que se manifesterait la sensibilisation comportementale (*Mattson et al., 2008*). Un autre aspect essentiel de ces études est l'apparition de sensibilisations croisées : les rats devenus hyperréactifs à la cocaïne le seront également à la morphine, aux amphétamines et au stress et vice versa (*Bonate et al., 1997; Cunningham et al., 1997*). Ceci est en accord avec le fait que toutes les drogues agissent, directement ou indirectement, en augmentant la libération de DA dans le CPU et le NAc (*Di Chiara and Imperato, 1988*).

3.2. Discrimination de drogues

Chez l'homme, la consommation de drogue psychoactive entraîne des effets subjectifs caractéristiques de la drogue consommée qui peuvent être décrits par le sujet. La capacité de percevoir et d'identifier les effets caractéristiques d'une drogue toxicomanogène donnée semble jouer un rôle critique dans la recherche de drogue car, sur la base de ces effets subjectifs, elle encourage le développement de ce comportement et oriente le toxicomane vers une substance donnée plutôt qu'une autre (*Colpaert, 1999*). En général, ces effets subjectifs sont évalués chez l'homme grâce à des échelles d'auto-évaluation.

Chez l'animal, le protocole généralement utilisé est le suivant : le rat est introduit dans une cage munie de deux leviers (A et B) qu'il peut actionner pour obtenir de la nourriture, de l'eau ou une solution sucrée. Quand la substance de référence est injectée avant la séance, seul le levier A est actif. Quand le solvant est injecté, c'est le levier B qui est actif. Le rat apprend peu à peu à associer son état interne (drogue ou placebo) à la réponse appropriée (A ou B). Au cours de la phase d'entraînement, on va augmenter le travail demandé à l'animal en passant graduellement d'un ratio fixe 1 (un appui requis pour la récompense) à un ratio fixe 10 (dix appuis requis pour la récompense). Quand le comportement du rat est stabilisé, après plusieurs sessions d'apprentissage, on procède à la séance test lors de laquelle on lui administre une autre molécule afin de déterminer si elle se substitue à la substance discriminante. Si l'animal appuie sur le levier A, il est possible de conclure que cette molécule induit des effets comparables à ceux de la drogue utilisée au cours de l'apprentissage (*Desai et al., 2003*). Cette procédure permet donc l'évaluation des effets subjectifs de composés pharmacologiques. La cocaïne a été testée selon ce protocole et il en ressort qu'elle produit des effets discriminants subjectifs chez l'animal de laboratoire (*D'Mello and Stolerman, 1977*).

3.3. Conditionnement de préférence de place

Parmi les diverses approches utilisées pour évaluer les propriétés de récompense et les effets appétitifs d'une drogue, le test de CPP est le plus utilisé. Ce paradigme permet d'évaluer la perception qu'a l'animal de la valeur renforçante intrinsèque de la drogue, qu'elle soit positive ou négative, ainsi que la « trace » laissée dans le souvenir de l'animal et son pouvoir évocateur (Tableau 4, p50 ; *Sanchis-Segura and Spanagel, 2006*). Dans la CPP, les effets subjectifs d'une substance constituent un stimulus non conditionné, ou stimulus primaire. Des stimuli environnementaux initialement neutres, associés de façon répétée à ce stimulus primaire, en acquièrent les propriétés motivationnelles. Ils deviennent des stimuli conditionnés qui, à l'issue du conditionnement, peuvent exercer des effets attractifs ou aversifs sur l'animal, selon que les propriétés motivationnelles primaires de la substance sont positives ou négatives.

Dans ces expériences, le rat est placé dans une cage qui comporte deux compartiments qu'il peut distinguer par la couleur des parois, la texture du sol et dans certains cas par différentes odeurs. Au cours d'une première séance, l'animal est libre d'explorer les compartiments. Dans une deuxième phase, l'animal est confiné dans un compartiment après l'administration de la drogue puis à la session suivante dans l'autre compartiment après l'administration du solvant. Le but de cette phase de conditionnement est d'induire chez l'animal l'association d'un contexte environnemental particulier avec les effets induits par une drogue. Par la suite, au cours de la troisième phase, l'animal est réintroduit dans la cage avec un accès libre aux différents compartiments. Au cours de cette phase, l'animal ne reçoit aucune injection de drogue. La modification de sa préférence pour un compartiment donné révèle la valeur renforçante (hédonique) de la substance testée. Si l'animal préfère le compartiment associé à l'injection de la drogue, celle-ci sera qualifiée de renforçante. Toutes les substances toxicomanogènes chez l'homme (amphétamine, cocaïne, ecstasy, éthanol, héroïne, morphine, nicotine, $\Delta 9$ -THC) induisent une forte CPP (*Tzschentke, 2007*). Des substances endogènes comme la testostérone, peuvent également montrer des propriétés appétitives. Certains comportements tels que les rapports sexuels (*Martinez and Paredes, 2001*) ou la prise de nourriture chez des animaux soumis à une privation (*Schroeder and Packard, 2002*) montrent aussi des propriétés de récompense. En revanche, si un rat est confiné dans un compartiment particulier lorsqu'il est dans la phase de sevrage d'une drogue (héroïne, nicotine), il évitera cet environnement ; on parle alors d'aversion de place conditionnée (CPA). Il faut noter aussi que certaines drogues toxicomanogènes induisent une

CPA (nicotine, éthanol, $\Delta 9$ -THC), surtout à des doses plus élevées par rapport à celles induisant une préférence (Tzschentke, 2007).

Ce protocole expérimental permet en outre de tester les animaux longtemps après la phase de conditionnement. C'est ainsi qu'un rat revient de façon préférentielle dans le compartiment où il a reçu une drogue (psychostimulant ou opiacé) même plusieurs mois après son conditionnement, révélant ainsi l'intensité du souvenir laissé par la drogue.

Cette procédure permet d'étudier l'effet de substances susceptibles d'interférer avec les différentes phases du conditionnement. Quand une substance est administrée avant les séances de conditionnement « sous drogue », elle peut interférer avec l'acquisition du conditionnement de place, c'est-à-dire modifier la perception qu'a l'animal de la valeur renforçante intrinsèque de la drogue. Quand la substance est administrée uniquement avant la séance de test, elle peut interférer avec l'expression du conditionnement de place, c'est-à-dire modifier la perception du pouvoir attractif (ou de la valeur appétitive) acquis par les stimuli initialement neutres qui ont été associés à la drogue.

Le dispositif et / ou la procédure de CPP peuvent être de deux types : biaisé ou non biaisé. Le dispositif est dit « biaisé », si les animaux présentent une préférence spontanée pour l'un ou l'autre des compartiments (préférence évaluée lors d'un prétest réalisé avant tout appariement avec une drogue). Dans ce cas, la drogue peut être systématiquement associée au compartiment préféré (dispositif biaisé, procédure biaisée). Alternativement, l'appariement peut être contrebalancé, la drogue étant associée au compartiment préféré pour la moitié des animaux et au compartiment le moins fréquenté pour l'autre moitié (dispositif biaisé, procédure non biaisée). Dans un dispositif « non biaisé », les animaux naïfs ne présentent pas de préférence spontanée pour l'un ou l'autre des compartiments et par conséquent, la procédure ne peut être que non biaisée également. Dispositif et procédure biaisés sont très critiquables car source de faux positifs. Une augmentation, même statistiquement significative, du temps passé dans le compartiment initialement le moins fréquenté peut ne pas représenter une « préférence », mais une diminution de l'aversion, le temps passé dans le compartiment associé à la drogue restant inférieur au temps passé dans l'autre compartiment. De même, si une drogue a une forte composante anxiolytique, elle peut s'opposer à l'aversion initiale pour le compartiment non préféré et augmenter la fréquentation de ce compartiment sans qu'il s'agisse de la manifestation d'un effet appétitif. C'est pourquoi il est préférable de privilégier les dispositifs de conditionnement de place non biaisés (Sanchis-Segura and Spanagel, 2006).

Notons que la CPP n'est pas un modèle de toxicomanie, puisque la substance est imposée par l'expérimentateur et non choisie par l'animal. Le conditionnement et le phénomène de renforcement démontrés par ce test sont complètement passifs et ne reflètent pas au mieux la mécanistique et les réseaux neuronaux impliqués dans le comportement addictif chez l'homme. En outre, la durée des protocoles et les quantités de drogue administrées à l'animal ne correspondent pas à celles consommées dans le test d'AA ou bien chez l'homme. Enfin certaines substances dont on sait qu'elles n'engendrent pas de dépendance chez l'homme, même après un traitement chronique, montrent des propriétés appétitives dans le test de CPP. C'est le cas de l'acide lysergique, ou LSD, un hallucinogène connu pour sa consommation récréative chez l'homme et qui induit une CPP (*Parker, 1996*). La CPP reste cependant un bon modèle animal pour prévoir l'effet d'une substance sur le système de récompense.

3.4. Auto-administration

Le modèle expérimental d'AA (orale, intraveineuse, intracérébroventriculaire ou intracérébrale) d'une drogue psychoactive prend en considération une variable mesurable qui s'apparente à la prise compulsive de drogue chez le toxicomane. Ce modèle permet d'étudier les propriétés renforçantes des drogues, qui se manifestent par un comportement actif de l'animal en vue de se procurer la drogue. L'infusion de drogue renforce la réponse de l'animal de façon contingente et induit l'acquisition d'un comportement qui déclenchera à nouveau l'infusion d'une dose ultérieure (Tableau 4, p50). L'étude de l'acquisition du comportement d'AA a permis de faire ressortir chez l'animal d'importantes différences de vulnérabilité à la drogue. Ce modèle tente de dégager des caractéristiques neurobiologiques et d'en déduire d'éventuels facteurs prédictifs pour l'homme.

Les procédures d'AA orale sont surtout utilisées pour les études sur l'alcool (*Gauvin et al., 1993*). En effet, les animaux peuvent soit avoir un accès restreint soit un accès permanent à des biberons contenant des solutions alcoolisées (généralement, 0, 5, 10 et 20 pourcents) et cela pendant de très longues périodes. Au fil du temps, les animaux se mettent à consommer de plus en plus d'alcool et surtout de plus en plus de la solution la plus fortement alcoolisée. Concernant l'AA orale, celle-ci peut également être utilisée dans des protocoles nécessitant un travail des animaux (pression sur un lever ou introduction du museau dans un orifice (l'abréviation NP provenant du terme anglais « nose-poke » est utilisée tout au long de

ce manuscrit)). Ainsi, une fois le travail accompli, la solution alcoolisée ou sucrée est accessible à l'animal dans une mangeoire (*Sharpe and Samson, 2003*).

Dans les procédures d'AA intraveineuse (*Dworkin and Stairs, 2003*), un cathéter est implanté dans la veine jugulaire du rat permettant à l'animal de s'auto-administrer une faible dose unitaire de drogue par pression sur un levier (lever press) ou suite à un NP. Le levier, ou l'orifice actif, est situé à côté d'un second levier, ou d'un second orifice, inactif dont l'actionnement n'a pas de conséquence prévue. La présence de l'orifice inactif permet de s'assurer que les rats apprennent bien à discriminer l'orifice renforçant : en effet, une fois leur comportement stabilisé, les rats effectuent en général plus de 90% de leurs actions vis-à-vis du levier ou de l'orifice actif. L'orifice inactif permet également de visualiser les effets non spécifiques d'une substance sur le comportement moteur du rat. Toute injection de drogue est suivie d'une période réfractaire (20 à 60 sec) au cours de laquelle le levier ou l'orifice actif est neutralisé pour éviter un éventuel surdosage. Les protocoles établis dans les tests d'AA peuvent être beaucoup plus complexes et subtils que dans les tests cités précédemment. Deux protocoles de renforcement sont utilisés principalement pour étudier le comportement d'AA. Les infusions y sont délivrées soit en ratio fixe (FR pour « fixed ratio »), soit en ratio progressif (PR pour « progressive ratio »). Dans les programmes de renforcement en FR, l'animal doit effectuer un nombre fixe et prédéfini de réponses pour obtenir chaque injection de drogue ; par exemple, dans un programme de renforcement en FR2, deux appuis sur le levier sont nécessaires pour obtenir une injection (*LeSage et al., 1999*). Dans les programmes de renforcement en PR, le nombre de réponses requis pour obtenir des injections successives augmente progressivement, selon un algorithme déterminé, généralement exponentiel, jusqu'à ce que l'animal arrête de répondre (*Richardson and Roberts, 1996*). On considère que le nombre d'appuis nécessaires à la délivrance de la dernière injection reçue avant la cessation des réponses (point de rupture) est un indice de l'effort consenti pour obtenir la drogue. Il reflète la motivation de l'animal pour obtenir la drogue. Un rat est capable d'appuyer plusieurs centaines de fois pour obtenir de la cocaïne (*Caine et al., 1993*).

Dans ces procédures, des stimuli externes sont souvent associés à l'infusion de la drogue (lumière / son émis au moment de l'injection). Ces stimuli environnementaux gagnent progressivement une valeur motivationnelle par des processus d'apprentissage associatif. Ils permettent d'une part à l'animal d'apprendre plus rapidement à discriminer le levier ou l'orifice actif de l'inactif. D'autre part, ils permettent de mesurer l'impact d'un environnement particulier et précis sur l'acquisition du comportement d'AA, sur la phase de sevrage et surtout sur la rechute.

Le terme de rechute fait référence à un phénomène de réinstallation du comportement de recherche de drogue après une période d'abstinence plus ou moins longue. La rechute ne peut être étudiée chez l'animal qu'après, soit une période de sevrage forcé, soit une période d'extinction du comportement d'AA. Elle pourra être induite, soit par une injection unique de drogue (on parle de « priming »), soit par un stress léger, soit encore par la simple réexposition d'un stimulus environnemental associé précédemment à la prise de drogue (*Shaham et al., 2003*). Ces stimuli deviennent des éléments renforçants par eux-mêmes, déterminants dans le comportement d'AA de drogue. Dans tous les cas, la rechute en AA se mesure en terme de nombre total de NP effectués dans l'orifice actif, mais sans que ces NP soient renforcés par des injections de drogue. Une caractéristique importante concernant la rechute à la cocaïne est que plus la durée du sevrage est longue et plus l'ampleur de la rechute est importante. Ce phénomène est appelé l'incubation du « craving » (*Grimm et al., 2001*).

La plupart des drogues toxicomanogènes chez l'homme sont des renforçants positifs effectifs chez l'animal dans la procédure d'AA, alors que, dans la majorité des cas, les drogues non toxicomanogènes ne le sont pas. Tout agent pharmacologique modifiant un paramètre de l'AA indique la possible intervention du mécanisme neurobiologique associé dans les effets de la drogue. Les conditions expérimentales utilisées sont très variables aussi bien en FR qu'en PR. Toutefois, l'analyse de la littérature permet de dégager certains facteurs qui facilitent la prise de cocaïne par l'animal :

- La fourchette des doses efficaces est relativement restreinte. Chez le rat, la dose de 0,3 mg/kg/infusion est communément utilisée dans une première approche. Il faut noter que la courbe dose-réponse de la cocaïne en FR n'est pas linéaire, mais est en forme de U inversé (*LeSage et al., 1999*). Par contre en PR, la courbe dose-réponse est linéaire, dans la limite des capacités physiques des rats.
- La vitesse d'injection doit être rapide (1 à 3 sec) et le volume injecté faible (10 à 50 µl), de sorte que l'arrivée de cocaïne dans le cerveau se fasse sous forme de « rush » (*Liu et al., 2005*).
- La phase d'activité nocturne est plus favorable à l'AA de cocaïne. C'est pour cela que les protocoles d'AA s'effectuent dans l'obscurité, après avoir procédé à un inversement du cycle nyctéméral des rats deux à trois semaines avant l'implantation du cathéter.
- La présence de stimuli associés à l'injection de cocaïne facilite sensiblement l'acquisition et le maintien de l'AA.

Ce test constitue le modèle animal de l'étude des effets d'une drogue se rapprochant le plus de ce que l'on observe chez l'homme. En effet, les protocoles étalés sur plusieurs semaines miment au mieux les prises répétées de l'homme et le comportement opérant de l'animal est central puisque, comme chez l'homme, c'est lui-même qui déclenche l'administration de la drogue.

Aspect de la dépendance modélisé	Sensibilisation	CPP	AA
Prise de drogue	Administration par l'expérimentateur (non contingence)		
Valeur hédonique ou « liking »	NON	OUI	OUI
Valeur motivationnelle ou « wanting »	NON	NON	OUI (en PR)
Apprentissage associatif	OUI	OUI	OUI
Rechute en réponse à la drogue au stress au signaux environnementaux	NON	OUI	OUI
Autres aspects modélisables	OUI (nourriture / sucrose / punition)		
Transposable à la souris	OUI	OUI	OUI
Permet de mesurer des différences de vulnérabilité	OUI	OUI	OUI
Permet d'étudier les effets neurobiologiques associés (biochimie, électrophysiologie, immunohistochimie)	OUI	OUI	OUI

4. L'épigénétique

4.1. Histoire et définition

Au XVIII^{ème} siècle, deux théories ont été proposées pour expliquer le développement embryonnaire : la préformation et l'épigénèse. La première considère que l'oeuf contient l'être en devenir, miniaturisé, mais formé. La seconde, énoncée par Aristote dès le IV^{ème} siècle avant notre ère, considère que l'œuf, indifférencié au moment de sa fécondation, se développe durant l'embryogenèse par formation successive de parties nouvelles jusqu'à atteindre le stade adulte. C'est cette théorie qui s'est imposée au fil du temps. Le terme « épigénétique » fut introduit en 1942 par Conrad Waddington pour désigner les processus par lesquels les gènes contrôlent le développement de l'organisme et son fonctionnement. L'épigénétique avait pour ambition de compléter la génétique qui, à l'époque se limitait à une énumération des gènes, et à leur positionnement sur les chromosomes. En créant ce mot et la science qu'il définit, Waddington a souligné l'incapacité de la génétique Mendélienne à expliquer le développement embryonnaire. L'épigénétique ne se limite pas seulement au développement et à la différenciation cellulaire. En effet, entre 1940 et 1970, l'épigénétique était invoquée dès que la génétique Mendélienne n'expliquait pas un phénomène. Ainsi l'épigénétique représente une vision complémentaire du contrôle de l'information génétique et non une simple théorie concurrente. Elle révèle l'extraordinaire richesse et diversité des mécanismes de contrôle de l'expression des gènes. Les modifications épigénétiques étant le fruit du fonctionnement cellulaire, elles sont sensibles aux variations de celui-ci liées à des changements de l'environnement. Le domaine de l'épigénétique est à même de combler la brèche entre l'inné et l'acquis. Ces modifications épigénétiques participent donc à la plasticité cellulaire. Sa place dans l'hérédité intergénérationnelle est limitée dans le temps et dans la nature des processus impliqués. Au cours des années, la définition de l'épigénétique a évolué pour être considérée aujourd'hui comme « l'étude de caractère, généralement réversibles, tel les changements des états de transcription des gènes, qui sont héréditaires au cours des divisions cellulaires, mais qui n'impliquent pas de changements de la séquence d'ADN ».

4.2. Chromatine et nucléosome

Dans les cellules eucaryotes, le matériel génétique est organisé en une structure complexe constituée d'ADN et de protéines et est localisé dans le noyau. La structure a été appelée chromatine par Fleming en 1882. Environ deux mètres d'ADN sont contenus dans chaque cellule, dans un noyau de quelques microns de diamètre (Figure 13 ; Kornberg, 1977). En plus de cet énorme degré de compaction, l'ADN doit rester rapidement accessible afin de permettre son interaction avec les machineries protéiques régulant la transcription des gènes, mais il doit également pouvoir être répliqué ou réparé.

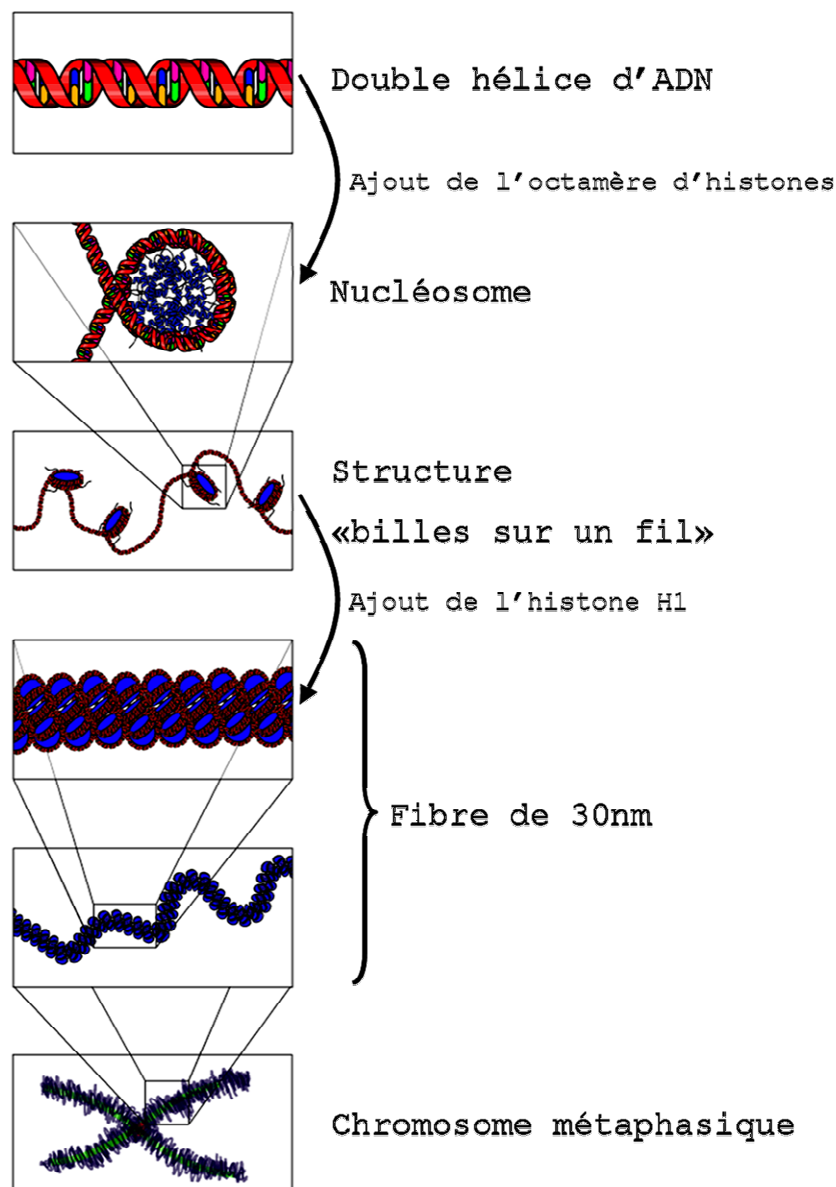


Figure 13 : **La compaction croissante du filament d'ADN**

La double hélice d'ADN s'enroule autour d'un octamère d'histones (H2A, H2B, H3 et H4) pour former le nucléosome. Ces derniers interagissent entre eux par le biais de l'histone H1 ce qui accroît le niveau de compaction de la chromatine en formant les fibres de 30 nm. Le niveau ultime de condensation est celui du chromosome, surtout pendant la métaphase.

La digestion partielle de la chromatine génère des fragments de 180 à 200 paires de bases, caractérisés par des images en « échelle » après migration électrophorétique. La régularité de cette structure a été confirmée par microscopie électronique révélant que la chromatine est constituée de particules régulièrement espacées, les nucléosomes. Le nucléosome est l'unité fondamentale de la chromatine (Figure 14). Il est composé d'une particule centrale et d'une région internucléosomale qui relie les particules adjacentes. La particule centrale est composée de 146 paires de bases enroulées sur 1,7 tour autour d'un octamère d'histones constitué de deux copies des histones H2A, H2B, H3 et H4 (*Luger et al., 1997*). Les histones sont des petites protéines (11 à 22 kDa) extrêmement bien conservées au cours de l'évolution, qui contiennent un domaine globulaire de nature hydrophobe, le domaine « histone fold ». Celui-ci est formé de trois hélices α et est impliqué dans la dimérisation des histones. Elles sont composées de plus de 20% de résidus dont la charge globale est positive (Arg ou Lys) ce qui en font des protéines très basiques. La présence de ces charges positives permet aux histones d'interagir avec le squelette phosphodiester de l'ADN chargé négativement, indépendamment de la séquence. Ces interactions représentent le premier niveau de compaction de l'ADN. Les régions N-terminales de ces protéines pointent vers l'extérieur du nucléosome.

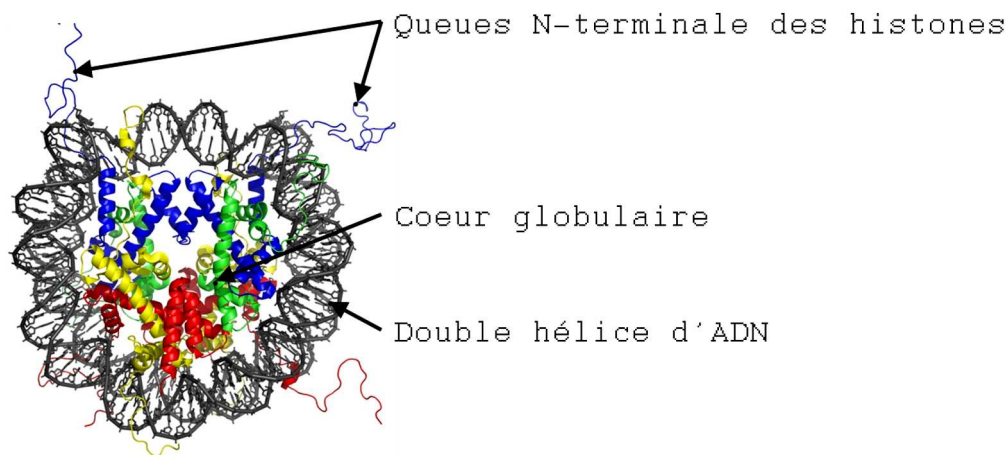


Figure 14 : **Le nucléosome**

L'unité fondamentale de la chromatine, le nucléosome, est constituée par un octamère d'histones comprenant deux exemplaires de chacune des protéines H2A, H2B, H3 et H4. Une longueur invariable d'ADN de 146 paires de bases s'enroule autour de chaque octamère (adapté de *Luger et al., 1997*).

C'est au niveau de la région internucléosomale que l'histone H1 est incorporée pour permettre le pontage entre deux nucléosomes adjacents. La longueur d'ADN entre deux nucléosomes varie selon les espèces entre 160 et 241 paires de bases. Ce pontage permet l'enroulement des nucléosomes sur eux-mêmes selon une hélice régulière comprenant six nucléosomes par tour. Cette fibre de 30 nm de diamètre est appelée fibre solénoïdale (*McGhee and Felsenfeld, 1980*). Celle-ci s'ancre sur la matrice nucléaire en formant des boucles d'ADN d'environ 300 nm de diamètre qui constitue la forme peu condensée du chromosome, ou euchromatine. Ces boucles d'ADN peuvent également se replier sur elles-mêmes pour constituer la forme très condensée du chromosome, ou hétérochromatine. Ces deux formes de chromatine définies par Heitz en 1928 présentent les caractéristiques suivantes (*Passarge, 1979*) :

- L'euchromatine est décondensée pendant l'interphase et constitue des fragments de génome accessibles aux facteurs de transcription ; elle est donc activement transcrite. Elle est répartie à l'intérieur du nucléoplasme.
- Par opposition, l'hétérochromatine est définie comme une structure qui ne change pas d'état de condensation au cours du cycle cellulaire et reste inaccessible aux facteurs de transcriptions. L'hétérochromatine est localisée principalement en périphérie du noyau et du nucléole. Les chromosomes contiennent de grands domaines d'hétérochromatine indispensables à leur fonction comme les centromères ou les télomères, mais ils renferment également des domaines hétérochromatiniens plus petits dispersés le long du chromosome (*Grewal and Elgin, 2002*). On distingue :
 - L'hétérochromatine constitutive qui contient très peu de gènes, formée principalement de séquences répétées et dont les plus grandes régions sont situées à proximité des centromères et des télomères.
 - L'hétérochromatine facultative qui contient des régions codantes pouvant adopter les caractéristiques structurale et fonctionnelle de l'hétérochromatine. En réponse aux signaux cellulaires, cette hétérochromatine facultative peut se décompacter pour atteindre les caractéristiques structurales de l'euchromatine.

4.3. Modifications épigénétiques

Les cellules qui composent un tissu expriment des fonctions spécifiques, caractéristiques de ce tissu. Pourtant, l'ADN est identique dans toutes les cellules d'un organisme donné. C'est pendant l'embryogenèse que les cellules acquièrent la capacité d'exprimer certains de leurs gènes à l'exclusion des autres. On sait que le processus de différenciation est orchestré par une interaction entre l'ADN et diverses protéines. La disposition et la répartition des protéines qui interagissent avec l'ADN déterminent si un gène se présente sous une conformation active permettant sa transcription, ou sous une forme inactive qui réduit le gène au silence. Ce sont ces différentes interactions entre protéines et ADN qui expliquent comment un même génome peut exprimer différentes fonctions dans différentes cellules. Divers facteurs ou mécanismes résultant de l'interaction de l'individu avec son environnement sont susceptibles de modifier l'expression des gènes: les variants des histones, la méthylation de l'ADN, les modifications posttraductionnelles des histones, les ARN interférants, les facteurs de remodelage de la chromatine dépendant de l'ATP (Figure 15). Ce sont les régulations épigénétiques.

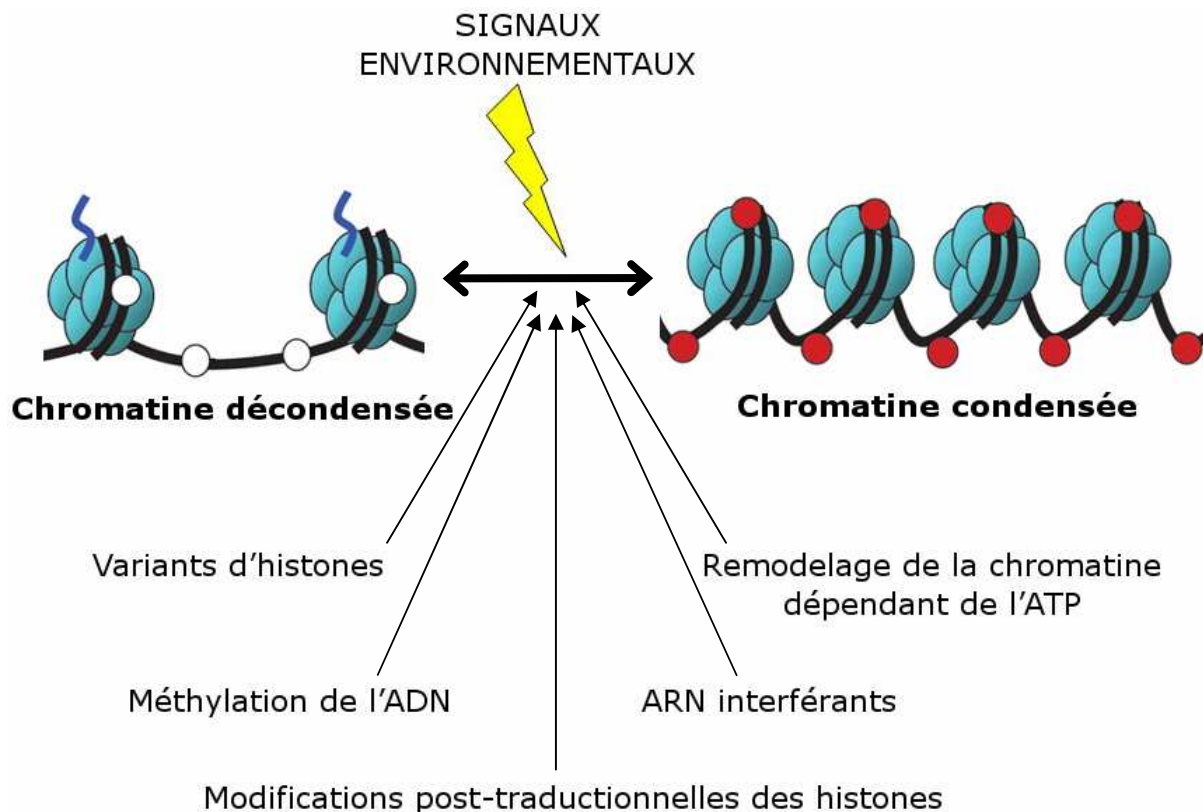


Figure 15 : **Transition entre chromatine condensée et décondensée en réponse aux signaux environnementaux**

La compaction de l'euchromatine décondensée ou la décompaction de l'hétérochromatine condensée en réponse à des signaux environnementaux puis cellulaires implique : l'échange entre différents variants des histones, la méthylation de l'ADN, les modifications posttraductionnelles des histones, les ARN interférant ou encore le remodelage de la chromatine sous l'effet d'enzymes dépendant de l'ATP.

4.3.1. Les histones et leurs variants

Chaque histone de l'octamère, sauf H4, ainsi que l'histone de liaison H1, existent dans la cellule sous plusieurs isoformes, qui ont des homologies de séquence variables et sont codées par des gènes différents (*Franklin and Zweidler, 1977*). L'ensemble de ces isoformes est regroupé sous le terme de « variants des histones ». On connaît actuellement onze variants pour l'histone H1, seize pour H2A, quatorze pour H2B, douze pour H3 et aucun pour H4 (*Lindner, 2008; Happel and Doenecke, 2009*). Il est depuis peu apparu que certains variants sont associés à des événements clés comme la méiose, la réplication de l'ADN, l'inactivation du chromosome X chez les femelles de mammifères, la mise en place de l'empreinte parentale de certains gènes autosomaux (*Trojer and Reinberg, 2007*) ou encore l'activation et la répression de la transcription (*Sarma and Reinberg, 2005*).

Concernant les variants de H2A, le génome humain contient dix gènes codant pour les variants H2A.1 (A à J) et un gène codant pour le variant H2A.2. De plus, cinq autres gènes *H2A* codent pour des protéines dont les séquences diffèrent considérablement des histones majoritaires ; il s'agit des variants H2A.Z et H2A.X, macroH2A.1 et macroH2A.2 et finalement H2A.Bbd (*Pehrson and Fried, 1992; Redon et al., 2002; Gonzalez-Romero et al., 2008*).

Par rapport aux variants de H2B, les isoformes H2B.1 (codées par onze gènes), H2B.2 et H2B.3 représentent les histones H2B majoritaires. Un seul variant de remplacement hTSH2B (« human testis/sperm-specific histone »), spécifique des tissus testiculaires et des spermatozoïdes, a été identifié à ce jour chez l'homme (*Zalensky et al., 2002*).

Les formes répliquatives de l'histone H3, c'est à dire celles qui sont incorporées pendant la phase S du cycle cellulaire, sont les histones H3.1 (codées par dix gènes) et H3.2 (codées par un seul gène) qui se distinguent par un seul acide aminé en position 96 (Cys et Ser respectivement) (*Hake and Allis, 2006*). La mise en place de l'histone H3.1 (sous forme dimérique H3.1-H4) au sein du nucléosome est assistée par un complexe d'assemblage de la chromatine contenant une protéine chaperonne, le facteur CAF-1 (« chromatin assembly factor 1 ») (*Moggs et al., 2000*). Le variant H3.3 se retrouve au niveau des loci transcriptionnellement actifs et subit des modifications posttraductionnelles relatives à l'activation de la transcription, telle que la di- et tri-méthylation de la Lys 4, l'acétylation des Lys 9, 18 et 23 et la méthylation de la Lys 79 (*Hake and Allis, 2006*). L'incorporation du variant H3.3 dans la chromatine nécessite son assemblage à un complexe contenant la

protéine chaperonne HIRA qui permet la formation de nucléosomes par l'intermédiaire d'une voie non couplée à la synthèse de l'ADN (Ray-Gallet *et al.*, 2002).

4.3.2. Méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est observée dans la plupart des organismes vivants, des bactéries aux mammifères (Bird, 2002). Elle concerne l'adénine et la cytosine chez les procaryotes, uniquement la cytosine chez les eucaryotes (plantes comprises) et la cytosine suivie d'une guanine chez les vertébrés (CpG). Les enzymes responsables de la réaction sont les ADN méthyltransférases (DNMT pour « DNA methyltransferase ») qui ajoutent un groupement méthyle sur le carbone 5 de la cytosine, pour former la 5-méthylcytosine en utilisant la S-adénosyl-L-méthionine comme donneur de groupement méthyle (Figure 16 ; Smith *et al.*, 1992; Allis *et al.*, 2007).

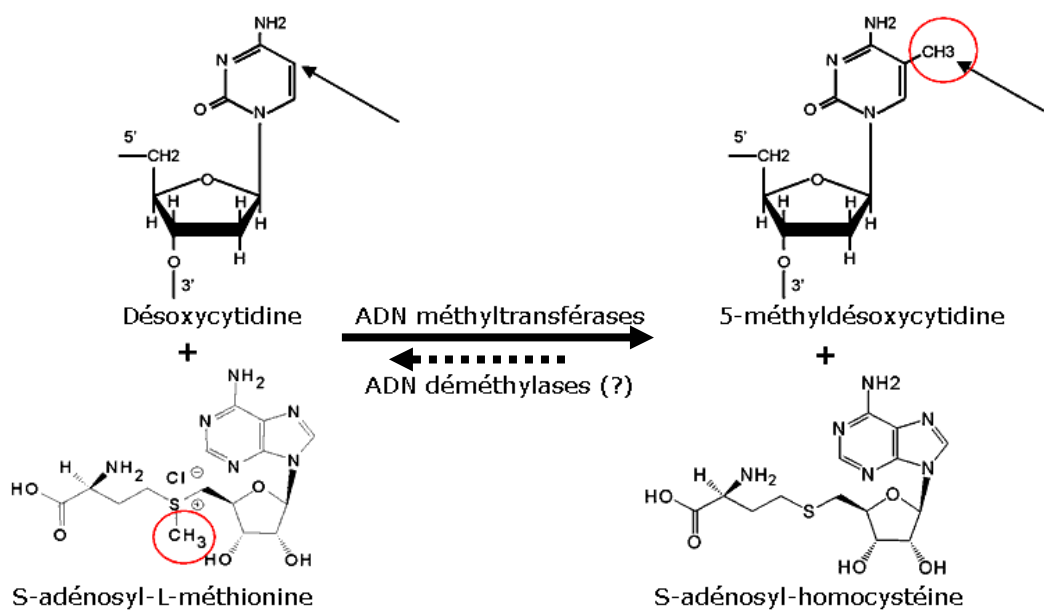


Figure 16 : **La méthylation de l'ADN**

La méthylation de l'ADN s'effectue sur la cytosine de l'ADN. Les ADN méthyltransférases (DNMT1, DNMT2 ou DNMT3) utilisent la S-adénosyl-L-méthionine comme donneur de groupement méthyle. Cette réaction aboutit à la formation de 5-méthyl-cytosine et de S-adénosyl-homocystéine. L'existence d'enzyme catalysant la réaction inverse n'est pas avérée.

Les DNMT possèdent un domaine régulateur N-terminal responsable de leur localisation nucléaire et un domaine catalytique en C-terminal (*Cheng and Blumenthal, 2008*).

Trois types de DNMT ont été mises en évidence :

- La DNMT1 joue un rôle dans le maintien des profils de méthylation au cours de la réplication de l'ADN (*Li, 2002*).
- La DNMT2 a été identifiée par homologie à la séquence des DNMT1, mais son rôle exact n'est pas connu. Elle possède une très faible activité enzymatique.
- La DNMT3, qui comprend deux isoformes, DNMT3_A et la DNMT3_B, est impliquée dans la méthylation *de novo* de l'ADN.

Les DNMT ont la capacité d'interagir avec d'autres facteurs comme des histones désacétylases (HDAC) ou des protéines se liant à l'ADN méthylé (MBD pour « methyl binding domain ») ce qui permet de modifier transitoirement la structure de la chromatine pour faciliter la méthylation de l'ADN (*Klose and Bird, 2006*).

La fréquence des dinucléotides CpG dans le génome humain est inférieure à ce que l'on attend d'une distribution aléatoire. Ce phénomène résulterait de l'hypermutableté des cytosine méthylées qui, par désamination, se transforment en thymine (*Issa, 1999*). On trouve des CpG dans l'ensemble du génome humain à l'exception de quelques régions où la fréquence des sites CpG est supérieure à une distribution aléatoire. Ces régions, appelées îlots CpG, sont généralement définies comme ayant une longueur d'au moins 200 paires de bases, une teneur en CpG d'au moins 50% et un rapport (CpG observés / CpG attendus) supérieur à 0,6 (*Gardiner-Garden and Frommer, 1987*). Ces îlots présentent les caractéristiques suivantes :

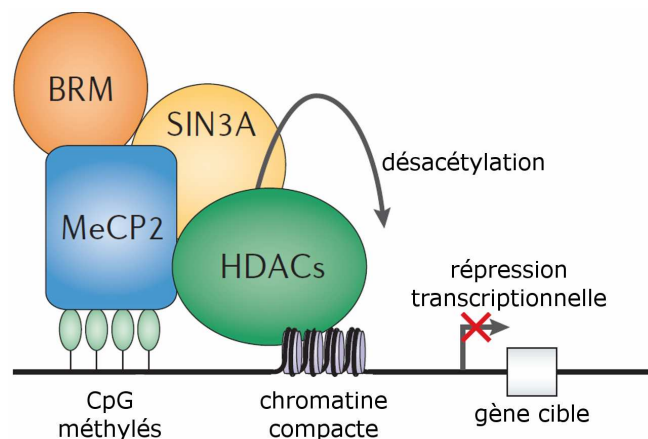
- Selon les estimations, il y en aurait entre 24000 et 27000 dans le génome humain (*Larsen et al., 1992; Illingworth et al., 2008*).
- Ils sont localisés majoritairement dans les régions 5' des gènes, au niveau du promoteur, du premier exon ou du premier intron (*Klose and Bird, 2006*).
- Seuls 6 à 8% des îlots sont méthylés de manière tissu-spécifique, ce qui suggère que le profil dynamique de méthylation de l'ADN joue un rôle lors de la différenciation cellulaire (*Suzuki and Bird, 2008*).

L'une des caractéristiques importantes de la méthylation de l'ADN est le fait que les groupements méthyles se logent dans le grand sillon de l'ADN. La conséquence de cette méthylation des îlots CpG au niveau des régions 5'-régulatrices d'un gène est la répression de la transcription du gène correspondant. Cette répression peut se faire grâce à deux mécanismes distincts (Siegfried *et al.*, 1999) :

- La transformation de la cytosine en 5-méthyl-cytosine inhibe la liaison de facteurs de transcription se fixant précisément sur ces régions promotrices (Watt and Molloy, 1988).
- La liaison à l'ADN méthylé de protéines MBD (Boyes and Bird, 1991; Hendrich and Bird, 1998) induit le recrutement d'autres protéines jouant un rôle dans la compaction de la chromatine (Lopez-Serra and Esteller, 2008). C'est le cas de MeCP2 (« methyl CpG binding protein 2 ») qui avec le cofacteur Sin3A recrute des HDAC ou des protéines de remodelage de la chromatine dépendant de l'ATP pour exercer une activité inhibitrice (Figure 17 ; Nan *et al.*, 1998).

Figure 17 : Rôle de MeCP2 dans la répression transcriptionnelle

Après liaison aux CpG méthylés de l'ADN, MeCP2 recrute d'autres facteurs avec Sin3A comme BRM (une protéine de remodelage chromatinien dépendant de l'ATP) et des HDAC. L'action de l'ensemble de ces facteurs conduit à la condensation de la chromatine et à l'inhibition de la transcription (adapté de Bienvenu and Chelly, 2006)



Classiquement, la méthylation de l'ADN est considérée comme une modification stable. Pour la réaction inverse, la déméthylation de l'ADN, il n'est pas établi si elle nécessite une activité déméthylase spécifique ou si la réaction est associée à la réplication. Bien qu'aucune ADN déméthylase n'ait été réellement caractérisée, d'autres protéines sont susceptibles d'intervenir dans ce mécanisme. La protéine MBD2 aurait, en plus de sa capacité à lier l'ADN méthylé, une activité déméthylase (Bhattacharya *et al.*, 1999), mais cette fonction est controversée (Santos *et al.*, 2002). La protéine Gadd45 α (« growth arrest and DNA-damage-inducible protein 45 α »), impliquée dans la réparation de l'ADN et l'inhibition de la croissance cellulaire, a aussi été proposée comme intervenant dans ce mécanisme de déméthylation (Barreto *et al.*, 2007).

4.3.3. Les modifications posttraductionnelles des histones

Outre la méthylation de l'ADN, les principales marques épigénétiques se situent sur les histones. Parmi celles-ci, les mieux caractérisées à ce jour sont l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation et l'ubiquitinylation des histones. Notons cependant que d'autres modifications ont été décrites, telles que la SUMOylation, l'ADP-ribosylation, la biotinylation, la déimination ou encore la glycoxydation (Tableau 5 ; Kouzarides, 2007).

Tableau 5 : Les différents types de modifications des histones

Modifications	Résidus modifiés	Enzymes impliquées
Acétylation	Lys	Histones acétyltransférases / Histones désacétylases
Méthylation	Lys monométhylée Lys diméthylée Lys triméthylée Arg monométhylée Arg diméthylée (symétrique) Arg diméthylée (asymétrique)	Histones méthyltransférases / Histones déméthylases
Phosphorylation	Ser Thr	Protéine kinases / phosphatases
Ubiquitinylation	Lys	Complexe E1, E2, E3 / Isopeptidases
SUMOylation	Lys	Complexe E1, E2, E3 / Isopeptidases
ADP-ribosylation	Arg Glu Ser phosphorylée	Mono-ADP- ribosyltransférase, poly-ADP-ribosyltransférase, Sirtuines / Glycohydrolases
Biotinylation	Lys	Holocarboxylases, biotinidases
Déimination	Arg	Peptidylarginine deiminase 4
Glycoxydation	Lys	ADP-ribose (sans intervention enzymatique)

Les extrémités N-terminales des histones H2A, H2B, H3 et H4 sont les cibles privilégiées de ces modifications posttraductionnelles (Tableau 6), bien que de nouvelles modifications aient également été identifiées dans d'autres régions. Ces modifications covalentes sont ciblées sur des résidus spécifiques pour chaque histone et sont catalysées, généralement de manière réversible, par des enzymes également spécifiques. La réversibilité des modifications des histones, tout comme celle de la modification par méthylation des CpG de l'ADN, met en évidence la plasticité de l'information épigénétique, à l'inverse du code génétique stable en dehors des événements de mutagenèse (Santos-Rosa and Caldas, 2005).

Tableau 6 : Résidus modifiés des différentes histones

Modification	H1	H2A	H2B	H3	H4
Acétylation	K25	K5, K9, K13	K5, K12, K15, K20	K4, K9, K14, K18, K23, K27, K56	K5, K8, K12, K16, K20
Méthylation	K25			K4, K9, K27, K36, K79, K122 R2, R8, R17, R26, R128, R129	K20 R3
Phosphorylation	S17, S26 T10, T17	S1 T120	S14, S33	S10, S28 T3, T11	S1
Ubiquitinylation		K119	K120		
SUMOylation		K126	K6, K7 K16, K17	Position ?	Position ?
ADP-ribosylation	E2, E15, E114, E115, E117 R33	E2	E ou R Position ?	E ou R Position ?	E ou R Position ?
Biotinylation		K9, K13, K125, K127, K129		K4, K9, K18	K8, K12
Déimination				R2, R8, R17, R26	
Glycoxydation	K Position ?	K Position ?	K Position ?		K Position ?

Résidus modifiés : E = glutamate, K = lysine, R = arginine, S = sérine, T = thréonine

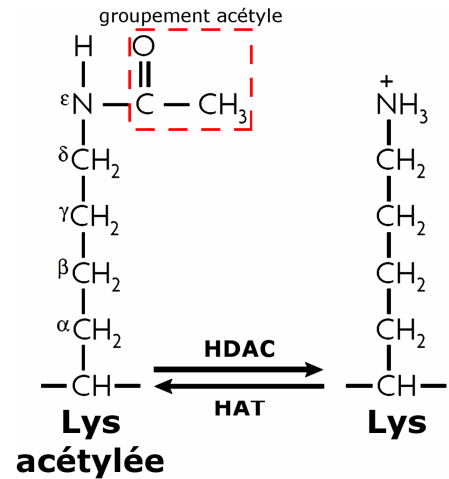
4.3.3.1. Acétylation

L'acétylation des histones s'effectue exclusivement sur des Lys (Tableau 5 p60). Elle est fortement associée à l'activation de la transcription (Marushige, 1976; Brownell and Allis, 1996). La réaction d'acétylation consiste en un transfert du groupement acétyle porté par une molécule d'acétyl-coenzyme A sur le groupement ϵ -aminé d'un résidu Lys. L'acétylation des histones est régulée par l'action concertée des histones acétyltransférases (HAT) et des HDAC (Figure 18 ; Roth et al., 2001; Walkinshaw et al., 2008). Les HAT et les HDAC font généralement partie de complexes multiprotéiques qui assurent aussi l'interaction avec des facteurs de transcription ou le couplage à des promoteurs spécifiques, ou encore la

reconnaissance du substrat chromatinien. Il a longtemps été supposé que la neutralisation de la charge positive des Lys pouvait mener à la diminution des contacts avec l'ADN nucléosomal. En fait, le rôle majeur de l'acétylation des histones est de permettre l'ancrage de protéines régulatrices établissant ou stabilisant l'euchromatine (*de la Cruz et al., 2005*). Ces changements aboutissent à une chromatine plus flexible, dans laquelle l'ADN est plus accessible et donc transcriptionnellement plus actif.

Figure 18 : L'acétylation des Lys

L'acétylation des histones, sur le groupement ϵ -aminé d'un résidu Lys, est régulée par l'action concertée des HAT et des HDAC



C'est en 1996, plus de trente ans après la découverte de l'acétylation des histones (*Allfrey et al., 1964*), que la première HAT a été identifiée, sous la forme d'un coactivateur transcriptionnel. De nombreuses HAT font partie de grands complexes enzymatiques recrutés au niveau des promoteurs de manière indirecte, grâce à des interactions avec des facteurs de transcription activateurs (*Sterner and Berger, 2000*). Elles peuvent être divisées en deux groupes : les HAT de type A qui sont nucléaires et responsables de l'acétylation des histones nucléosomales et les HAT de type B qui sont cytoplasmiques et responsables de l'acétylation des histones néosynthétisées avant le transport dans le noyau et l'incorporation dans la chromatine (*Ruiz-Carrillo et al., 1975*). Vingt-deux HAT de type A sont actuellement référencées. Elles peuvent être subdivisées en six familles : la famille ATF-2 (« activating transcription factor-2 »), la famille CBP/p300, la famille GNAT (« GCN5-related N-acetyltransferase »), la famille MYST, la famille SRC et la famille TAF_{II}250 (*Marmorstein, 2001*).

4.3.3.2. Désacétylation

En ce qui concerne la réaction de désacétylation, on compte dix HDAC chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Les protéines Rpd3, Hos1 et Hos2 forment la classe I. Les membres de la classe II sont les protéines Hda1 et Hos3 d'après une analyse phylogénétique récente (*Gregoretta et al., 2004*). La protéine Sir2 et les quatre protéines Hst (homologue de

Sir2, aussi connue comme sirtuines) constituent la classe III. Chez l'homme, dix-huit HDAC ont été recensées (Tableau 7). Elles sont réparties en quatre groupes selon leur homologie de séquence avec les HDAC de *S. cerevisiae*, ainsi que leur localisation cellulaire et leur spécificité de substrat (*de Ruijter et al., 2003; Yang and Seto, 2008*) :

- Les HDAC de classe I (HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8) sont des homologues de Rpd3,
- Les HDAC de classe IIa (HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9) et IIb (HDAC6, HDAC10) sont des homologues de Hda1,
- Les HDAC de classe III (SIRT1 à 7) sont des homologues de Sir2,
- La seule HDAC de classe IV (HDAC11) est homologue de Rpd3.

L'expression de ces différentes classes de HDAC est très variable selon le tissu considéré. Certaines sont exprimées de façon ubiquitaire, d'autres présentent une répartition plus restreinte. Dans le cerveau, les ARNm codant certaines HDAC sont très fortement exprimés, alors que d'autres le sont plus faiblement. Les HDAC 3, 4, 5 et 11 sont très fortement présentes, alors que les HDAC 6, 9 et 10 ne sont quasiment pas représentées dans ce tissu (*Figure 19 ; Broide et al., 2007*). Ces HDAC sont principalement exprimées dans les neurones, mais certaines sont aussi détectables dans les oligodendrocytes.

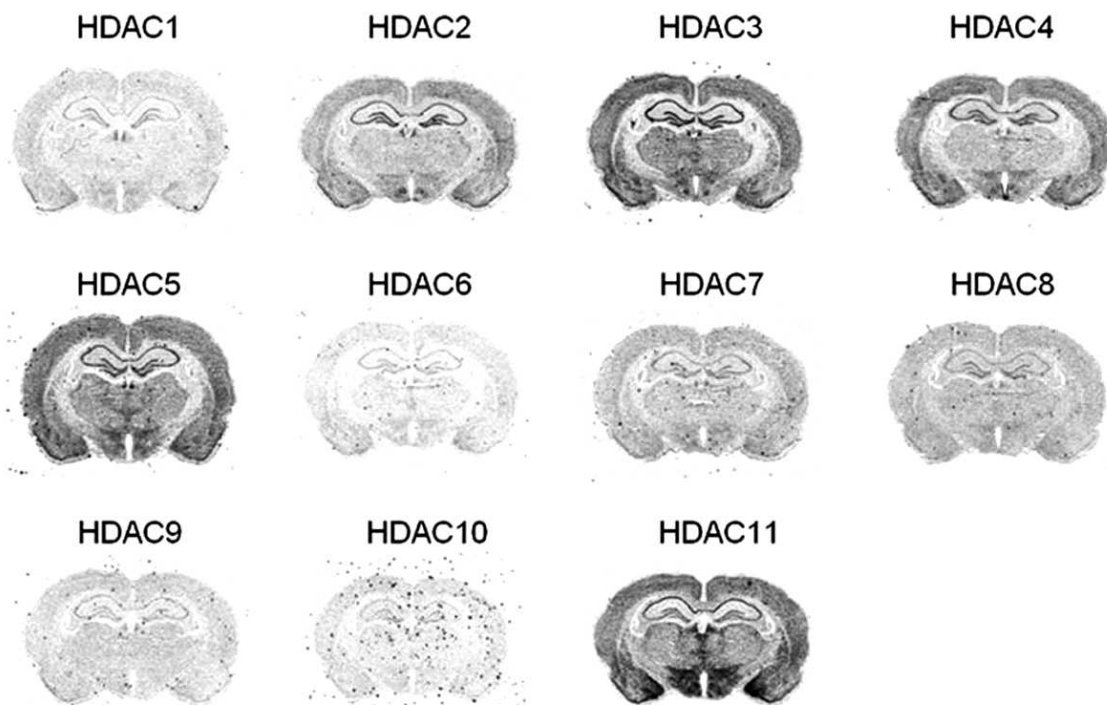

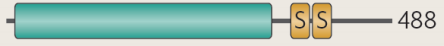

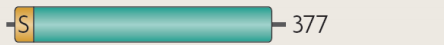









Figure 19 : **Distribution des 11 HDAC dans le cerveau de rat**
 Autoradiographies représentatives des 11 HDAC au niveau d'une même région cérébrale (Bregma -3,1) obtenues après hybridation *in situ* (d'après *Broide et al., 2007*).

Tableau 7 : Les différentes HDAC

		Cofacteur	Compartimentation
Classe I			
HDAC1		Zn ²⁺	Noyau
HDAC2		Zn ²⁺	Noyau
HDAC3		Zn ²⁺	Noyau / Cytoplasme
HDAC8		Zn ²⁺	Noyau
Classe IIa			
HDAC4		Zn ²⁺	Noyau / Cytoplasme
HDAC5		Zn ²⁺	Noyau / Cytoplasme
HDAC7		Zn ²⁺	Noyau / Cytoplasme
HDAC9		Zn ²⁺	Noyau / Cytoplasme
Classe IIb			
HDAC6		Zn ²⁺	Noyau / Cytoplasme
HDAC10		Zn ²⁺	Noyau / Cytoplasme
Classe IV			
HDAC11		Zn ²⁺	Noyau
Classe III			
SIRT1		NAD ⁺	Noyau
SIRT2		NAD ⁺	Cytoplasme
SIRT3		NAD ⁺	Mitochondrie
SIRT4		NAD ⁺	Mitochondrie
SIRT5		NAD ⁺	Mitochondrie
SIRT6		NAD ⁺	Noyau
SIRT7		NAD ⁺	Noyau

Barre bleue : domaine de liaison à MEF2 ; Barre verte : domaine désacétylase ; Leucine rich : motif riche en Leu ; S : Ser ; ZnF : motif en doigt de zinc ; (d'après les données de Mai et al., 2005; Porcu and Chiarugi, 2005; Haberland et al., 2009).

4.3.3.2.1. HDAC de la classe I

Les HDAC de classe I sont exprimées exclusivement dans le noyau et sont présentes dans tous les tissus. HDAC1 et HDAC2 présentent une identité de séquence d'environ 82%. Leur domaine catalytique constitue la majeure partie de la protéine. *In vivo*, les HDAC1 et 2 doivent faire partie intégrante de grands complexes macromoléculaires pour être actives. Ces complexes contiennent des protéines qui modulent l'activité enzymatique, mais aussi des protéines qui permettent la fixation des HDAC sur les promoteurs de gènes. Trois de ces complexes ont été décrits : Sin3A-Sin3B, NuRD (« nucleosome remodeling and deacetylation ») et Co-REST (Denslow and Wade, 2007). HDAC1 et 2 peuvent aussi s'associer avec des DNMT (Fuks et al., 2001), des histones méthyltransférases (Czernin et al., 2001) et des topoisomérases pour former un complexe réprimant la transcription. HDAC1 et 2 sont capables également de se lier directement à des protéines fixant l'ADN comme YY1, Rb et SP1 (Brehm et al., 1998; Giordano and Avantaggiati, 1999).

HDAC3 possède une séquence d'exportation nucléaire et fait également partie intégrante de complexes macromoléculaires comme N-CoR ou SMRT (Guenther et al., 2001). HDAC3 est capable de former des oligomères *in vitro* et *in vivo* avec d'autres HDAC.

HDAC8 n'est présente ni chez *S. cerevisiae* ni chez *D. melanogaster*. Pour l'instant, sa participation dans un complexe protéique n'a pas été démontrée. Elle a été détectée dans le cytosol des cellules musculaires lisses en différenciation (Waltregny et al., 2005) associée avec le cytosquelette d'actine.

En plus de désacétyler les histones, les HDAC de la classe I peuvent exercer leur activité catalytique vis-à-vis d'autres protéines nucléaires : des facteurs de transcription tels p53, Ying Yang 1, STAT3, les récepteurs nucléaires des androgènes ou des oestrogènes, MyoD, E2F/Rb ou encore NF-κB (Glozak et al., 2005).

4.3.3.2.2. HDAC de la classe II

Contrairement aux HDAC de la classe I, celles de la classe II sont exprimées de manière tissu-spécifique (Verdin et al., 2003) et sont présentes dans le noyau comme dans le cytoplasme (Grozingler and Schreiber, 2000). Elles peuvent être regroupées en deux sous-classes : la sous-classe IIa (HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9) et la sous-classe IIb (HDAC6, HDAC10) (Verdin et al., 2003). Les HDAC de la classe IIa contiennent deux régions fonctionnelles distinctes :

- La région N-terminale qui contient un site de fixation pour les facteurs de transcription de la famille MEF2 (« Myocyte Enhancer Factor 2 ») et des Ser impliqués dans la

régulation par phosphorylation de la localisation subcellulaire (*Grozinger and Schreiber, 2000*).

- La région C-terminale contenant le domaine catalytique (*Martin et al., 2007*).

Les HDAC de la classe IIa peuvent être présentes, en fonction du contexte, dans le compartiment nucléaire et/ou le cytoplasme. En effet, elles possèdent une séquence de localisation nucléaire et une séquence d'exportation nucléaire leur conférant la propriété de traverser les pores nucléaires. Une fois la HDAC phosphorylée sur une Ser, la protéine 14-3-3 s'y fixe et transporte ces HDAC du compartiment nucléaire vers le cytoplasme. Une fois déphosphorylée elle sera transportée à nouveau vers le noyau (*McKinsey et al., 2000*). Le site majeur de fixation de la protéine 14-3-3 sur les HDAC se juxtapose à la séquence de localisation nucléaire. Sa fixation empêche l'accès de l'importine et bloque l'import nucléaire (*Grozinger and Schreiber, 2000*). Quatre groupes de kinases sont susceptibles de phosphoryler les sites de liaison de la protéine 14-3-3 sur les HDAC : les Ca²⁺/CaM kinases (*Linseman et al., 2003*), la protéine kinase D (*Vega et al., 2004*), les kinases inductibles par le sodium (*van der Linden et al., 2007*) et la kinase checkpoint 1 (*Kim et al., 2007*). A l'opposé, deux protéines phosphatases ont été identifiées: la protéine phosphatase 1β (*Parra et al., 2007*) et la protéine phosphatase 2A (*Sucharov et al., 2006*). Les HDAC IIa peuvent interagir avec une des quatre isoformes de MEF2 (MEF2A, B, C et D) et bloquer ainsi son activité transcriptionnelle.

HDAC6 et 10 sont les deux représentants de la classe IIb. HDAC6 est la désacétylase majeure présente dans le cytoplasme des cellules de mammifères. Elle ne désacétyle pas des histones, mais des protéines cytoplasmiques telles la sous-unité α de la tubuline et la cortactine, des chaperones ou encore le récepteur de l'interféron (*Hubbert et al., 2002; Kovacs et al., 2005; Tang et al., 2007; Zhang et al., 2007*). HDAC6 est aussi la seule HDAC possédant deux sites catalytiques et un motif en doigt de zinc à l'extrémité C-terminale (*Haberland et al., 2009*). Il est clair que la présence des deux domaines est nécessaire pour observer une activité catalytique chez HDAC6 (*Zhang et al., 2003*). Comme la plupart des HDAC de classe II, HDAC6 fait la navette entre le noyau et le cytoplasme (*Verdel et al., 2000*).

On ne possède que des données fragmentées concernant HDAC10. Elle renferme un domaine catalytique sur sa partie N-terminale, une séquence d'exportation nucléaire et un domaine incomplet côté C-terminal. De plus, deux domaines potentiels fixant la protéine RB ont été découverts sur HDAC10, suggérant un rôle dans la régulation du cycle cellulaire.

4.3.3.2.3. HDAC de la classe IV

Le seul et unique représentant de la classe IV est HDAC11, initialement répertoriée dans la classe I. Clonée et caractérisée en 2002 (Gao *et al.*, 2002), HDAC11 possède des similarités de séquences et des propriétés communes aux HDAC de la classe I et II. Elle est extrêmement conservée de *Caenorhabditis elegans* à *Homo sapiens*. Cette protéine est principalement nucléaire et sa taille est du même ordre que celle des HDAC de classe I. Pourtant, HDAC11 est exprimée dans le coeur, le cerveau, le muscle squelettique et les reins, ce qui est typique des HDAC de classe II. Bien qu'elle interagisse avec HDAC6 dans le noyau (Gao *et al.*, 2002), HDAC11 n'est retrouvée dans aucun complexe répresseur d'HDAC connu. Parmi le peu d'informations dont on dispose quant à ses fonctions, citons son implication dans la régulation de l'expression de l'interleukine 10 et dans l'activation de la réponse immunitaire (Villagra *et al.*, 2009).

4.3.3.2.4. HDAC de la classe III

Les HDAC de classe III, les sirtuines, constituent une classe particulière puisqu'elles ne présentent pas d'homologie de séquence avec les HDAC des classes I et II et IV. Ce sont des homologues de la protéine Sir2 de *S. cerevisiae* (Imai *et al.*, 2000). Elles contiennent un domaine catalytique de 275 acides aminés qui utilise un mécanisme complètement différent impliquant le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺) comme substrat. Sir2 couple la désacétylation des histones au clivage d'une liaison de haute énergie du NAD⁺ (Porcu and Chiarugi, 2005). Cette réaction de désacétylation est étroitement liée à la formation d'acétyl-ADP-ribose. Une molécule de NAD⁺ et d'acétyl-lysine sont transformées en une molécule de Lys désacétylée, de la nicotinamide et du 2'-O-acétyl-ADP-ribose (Avalos *et al.*, 2005). La dépendance des sirtuines au NAD⁺ leur confère un rôle intermédiaire entre le métabolisme énergétique et la transcription des gènes. Les SIRT4 et 6 présentent également une activité ADP-ribosyl transférase. Ces enzymes interviennent dans la désacétylation des histones, mais surtout dans la désacétylation d'autres protéines nucléaires et cytoplasmiques (Saunders and Verdin, 2007). En effet, SIRT1 est responsable de la désacétylation de nombreuses protéines intervenant dans la régulation transcriptionnelle, comme p53, les HAT PCAF, CBP/p300 ou NF-κB (Vaziri *et al.*, 2001; Fulco *et al.*, 2003; Motta *et al.*, 2004). Ceci explique l'implication des sirtuines dans les mécanismes d'apoptose, de survie cellulaire, dans la transcription et le métabolisme cellulaire. La protéine cytoplasmique SIRT2 désacétyle la sous-unité α de la tubuline des microtubules comme HDAC6 (North *et al.*, 2003). SIRT3, 4 et 5 présentent une localisation exclusivement mitochondriale, un compartiment cellulaire totalement dépourvu

d'histones (*Schwer et al., 2002*). SIRT6 est la seule sirtuine nucléaire qui possède à la fois une activité désacétylase et une activité ADP-ribosyl transférase. En désacétylant l'histone H3, elle joue un rôle direct dans la structuration des télomères (*Michishita et al., 2008*). Enfin, SIRT7 active la RNA polymérase I et désacétyle le facteur de transcription p53.

4.3.3.2.5. Inhibiteurs de HDAC

Etant donné que les HDAC des classes I, II et IV diffèrent des sirtuines du point de vue de leur activité enzymatique, leurs inhibiteurs respectifs sont également différents structurellement et fonctionnellement.

Les inhibiteurs des HDAC (HDACi) des classes I, II et IV peuvent être répartis en cinq classes : les acides gras à courte chaîne aliphatique, les acides hydroxamiques, les tétrapeptides cycliques, les benzamides et les époxydes. L'IC₅₀ *in vitro* de ces différents HDACi varie : il est de l'ordre du mM pour les acides gras à courte chaîne, de l'ordre du µM pour les acides hydroxamiques et les benzamides, voire de l'ordre du nM pour les tétrapéptides cycliques et certains acides hydroxamiques (Tableau 8 p70-71 ; *de Ruijter et al., 2003; Marks et al., 2003*). Pour l'ensemble des HDAC, la TsA présente un IC₅₀ de l'ordre de 10nM, la dépudécine un IC₅₀ de l'ordre de 10µM et le phénylbutyrate de l'ordre de 10 mM.

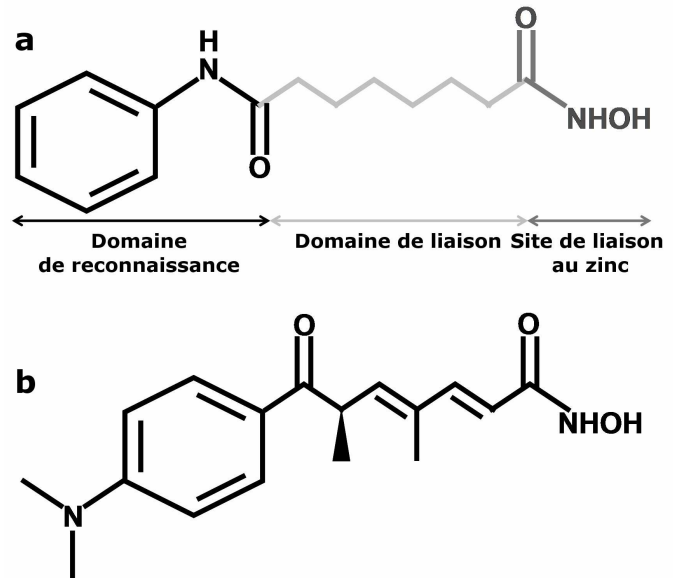
L'étude structurale de ces HDACi a permis de définir un pharmacophore modèle des HDACi (Figure 20a ; *Miller et al., 2003*). Celui-ci se composerait d'un domaine de reconnaissance formé généralement d'une région hydrophobe très souvent aromatique, d'un domaine de liaison soit linéaire soit aromatique et enfin d'un site de liaison à l'ion zinc. L'exemple type d'HDACi répondant à cette définition est la trichostatine A (TsA), un antibiotique et antifongique isolé à partir de *Streptomyces hygroscopicus*. C'est le premier agent antiprolifératif à avoir été identifié comme HDACi (Figure 20b ; *Yoshida et al., 1990*).

Les HDACi fonctionnent généralement en déplaçant l'ion zinc, causant un dysfonctionnement dans le système de transfert de charge. Ils bloquent ainsi l'accès au site actif de façon réversible ou irréversible. Toutes les HDAC de classe I et II et IV sont inhibées par la TsA (*Marks et al., 2001; Marmorstein, 2001; Yoshida et al., 2001*). Aucune sirtuine n'est inhibée par les HDACi conventionnels. Bien que tous les HDACi soient réversibles il existe deux exceptions, la dépudécine et la trapoxine, qui inhibent les HDAC irréversiblement en formant une liaison covalente au niveau du site actif (*Furumai et al., 2001*). Toutes les HDAC sont inhibées sensiblement de la même façon par un HDACi donné, mais il existe des exceptions. Tout d'abord HDAC6, qui sans doute parce qu'elle possède deux sites catalytiques, est sensible à certains HDACi (TsA), mais pas à d'autres (trapoxine) (*Furumai*

et al., 2001). Par ailleurs, alors que la TsA inhibe toutes ces HDAC avec une IC_{50} comparable, le MS-275 inhibe HDAC1 avec une IC_{50} de $0,3 \mu\text{M}$, HDAC3 avec une IC_{50} de $8 \mu\text{M}$ et n'inhibe pas HDAC8 (*Hu et al.*, 2003). Le développement d'HDACi plus sélectifs d'une HDAC donnée permettra sans doute de mieux élucider le rôle de cette dernière dans un mécanisme donné.

Figure 20 : Le pharmacophore type des HDACi

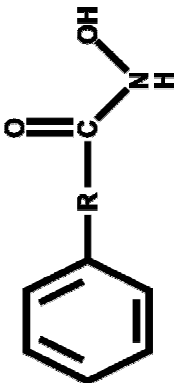
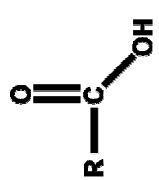
(a) Le pharmacophore est formé d'un domaine de reconnaissance des HDAC, d'un domaine de liaison pouvant être plus ou moins long et complexe et enfin d'un domaine de liaison à l'ion zinc. (b) La TsA présente l'ensemble de ces trois domaines (d'après *Miller et al.*, 2003).



Concernant les effets des HDACi, il est clair qu'ils induisent aussi bien une augmentation qu'une diminution de l'expression de nombreux gènes cibles. L'analyse génomique des effets d'HDACi sur l'expression génique dans diverses lignées de cellules cancéreuses a montré que les variations d'expression étaient sensiblement similaires pour différents HDACi (*Mitsiades et al.*, 2004; *Peart et al.*, 2005). De manière assez générale, l'inhibition des HDAC induit l'arrêt de la croissance et la différenciation cellulaire ou encore l'apoptose dans un large spectre de cellules cancéreuses en culture et dans des modèles d'animaux porteurs de tumeurs (*Marks et al.*, 2001). Cela semble être la conséquence d'une hausse de l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs, de gènes impliqués dans la différenciation cellulaire ou dans l'apoptose. Ainsi de nombreux HDACi présentent une activité anticancéreuse *in vitro*, mais aussi *in vivo*, d'où les nombreux essais cliniques actuellement en cours (Tableau 8 p70-71 ; *Batty et al.*, 2009). Pour l'instant, un seul de ces essais a abouti à la mise sur le marché américain du Vorinostat (acide subéroylanilide hydroxamique ou SAHA) pour le traitement des lymphomes cutanés (*Mann et al.*, 2007).

Les inhibiteurs des sirtuines (*Porcu and Chiarugi*, 2005) sont la nicotinamide, produit formé lors de la réaction enzymatique de désacétylation (*Avalos et al.*, 2005), le sirtinole ou la spilomycine (*Grubisha et al.*, 2005). De nombreux polyphénols issus de plantes ont été décrits comme des activateurs des sirtuines : butéine, fisétine, lutéoline, quercétine ou resvératrol (*Howitz et al.*, 2003).

Tableau 8 : Les différentes classes de HDACi, leurs structures et leurs avancés cliniques en oncologie

Classe	Structure générique	Membres	Phase clinique
Acides Hydroxamiques		Acide carboxycinnamique bishydroxamique	
		Acide subérylanilide hydroxamique = SAHA	Approuvé par la FDA pour les lymphomes cutanés primaires
		Acide sulfonamide hydroxamique	
		ITF-2357	II
		LAQ-824	I
		LBH-589	II
		Oxamflatine	Préclinique
		PXD-101	II
		Pyroxamide	I
		SB-939	I
Scriptaide			
Trichostatine A = TsA			
Acides gras à courte chaîne aliphatique		Acide butyrique	
		Acide phénylbutyrique = PhB	II
		Acide valproïque	II
		AN-9 = Pivanex	II

Classe	Structure générique	Membres	Phases cliniques
Benzamides		MGCD-0103 MS-275 N-aceéylidinaline	II II II et III
Tétrapeptides cycliques		Apidicine Chlamydocine Depspéptide = FK-228 Trapoxine (A et B)	Préclinique II Préclinique
Epoxydes		Dépuécine	

Au niveau des structures génériques, les « R » représentent les régions variables.

4.3.3.3. Méthylation / déméthylation

La méthylation des histones a lieu sur des résidus Lys ou Arg (Tableau 5 p60). Contrairement à l'acétylation ou à la phosphorylation généralement associées à l'activation de la transcription, la méthylation des histones peut avoir un effet activateur ou répresseur selon la position du résidu affecté et la nature de la modification. En effet, il existe trois degrés différents de méthylation : la mono-, la di- et la tri-méthylation (*Akbarian and Huang, 2009*). Alors que les mono- et di-méthylations sont associées aux Lys et aux Arg, les triméthylations ne se retrouvent que sur les Lys. Il semble que le degré de méthylation soit un indicateur du degré de transcription (*Ng et al., 2009*). La réaction consiste en un transfert du groupement méthyle porté par une molécule de S-adénosyl-L-méthionine sur le groupement ϵ -aminé des résidus Lys ou Arg (*Zhang and Reinberg, 2001*). La méthylation des histones est catalysée par trois familles d'histones méthyltransférases qui ne sont pas toutes spécifiques des histones (*Bedford, 2007*) : la famille des arginine-méthyltransférases qui catalysent la méthylation des Arg, les enzymes contenant un domaine SET (« su(var)39 enhancer trithorax ») qui catalysent la méthylation des Lys et enfin les méthyltransférases associées aux membranes.

Les arginine-méthyltransférases sont au nombre de dix et sont subdivisées en quatre classes (Type I, II, III et IV) selon qu'elles catalysent une diméthylation symétrique ou asymétrique (Figure 21 ; *Kouzarides, 2007*).

Les vingt-huit protéines méthylant les Lys et qui contiennent un domaine SET peuvent être subdivisées en quatre classes : SET1, SET2, RIZ et la classe SUV39 (« suppressor of variegation 39 »). Elles sont toutes capables de mono- ou di-méthyler les Lys (Figure 22 ; *Kouzarides, 2002*).

Les enzymes catalysant la réaction de déméthylation, les histones déméthylases, n'ont été identifiées que récemment. Il en existe actuellement dix-huit regroupées en six familles spécifiques des Lys (*Allis et al., 2007*). Chacune de ces familles présente une spécificité de déméthylation soit vis-à-vis de Lys particulières soit vis-à-vis du degré de méthylation (*Lan et al., 2008*). La seule enzyme spécifique des Arg monométhylés est la protéine PADI4 (« peptidylarginine deiminase 4 »), mais son action aboutit à la formation de citrulline (*Wang et al., 2004*).

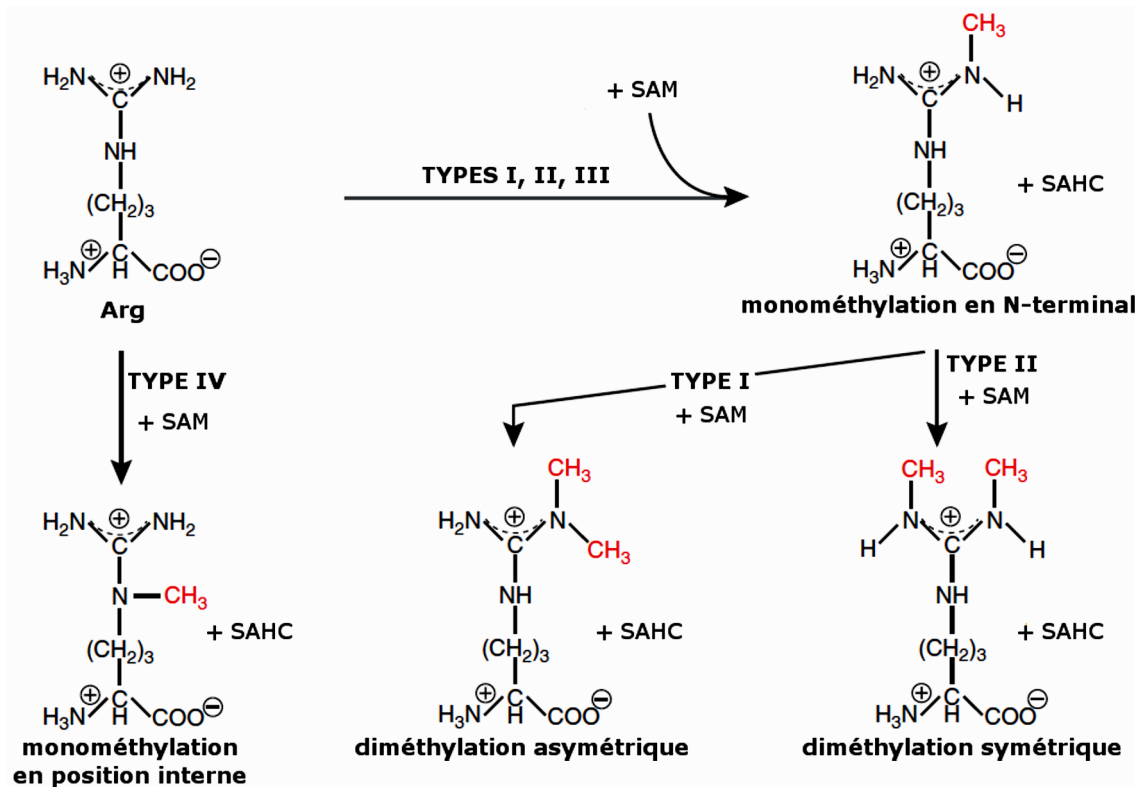


Figure 21 : La méthylation des histones sur les résidus Arg
(inspiré de Bedford, 2007).

Les dix protéines Arg méthyltransférases catalysent l'ajout de groupements méthyles sur les Arg des histones. Elles utilisent toujours le S-adenosyl-méthionine (SAM) comme donneur de méthyle et il y a toujours formation de S-adenosyl-homocystéine (SAHC). Les enzymes de la classe I forment les groupements diméthylés asymétriques, alors que les PMRT de la classe II forment les groupements diméthylés symétriques.

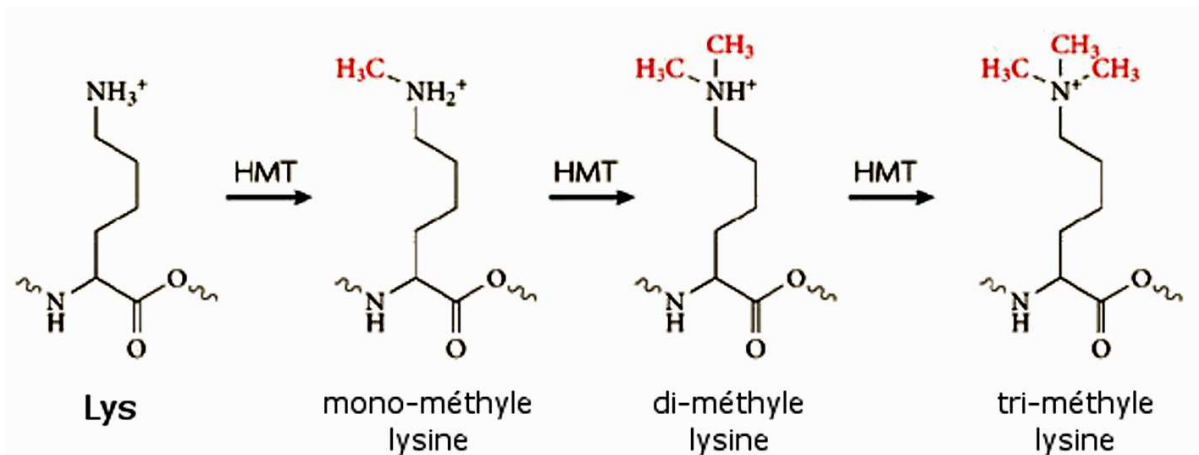


Figure 22 : La méthylation des histones sur les Lys
Ce type de méthylation aboutit à la formation de Lys mono-, di- ou tri-méthylées.

4.3.3.4. Phosphorylation

La phosphorylation des histones s'effectue sur des résidus Ser ou Thr. (Tableau 5 p60 ; *Nowak and Corces, 2004*). La phosphorylation réversible des histones est impliquée dans l'activation de la transcription, l'apoptose (*Rogakou et al., 2000*), la réparation de l'ADN (*Rogakou et al., 1998*) ou dans la condensation des chromosomes durant la mitose (*Koshland and Strunnikov, 1996*). La réaction de phosphorylation des histones consiste en un transfert d'un groupement phosphate de l'ATP sur les Ser ou Thr. Parmi les nombreuses kinases de la cellule, seule la MSK1/2 (« mitogen- and stress-activated kinase 1 and 2 ») est associée avec la phosphorylation des histones (*Thomson et al., 1999*). L'activation de ces kinases passe par la voie des MAP kinase ERK1/2 ou p38. Différentes Ser/Thr protéine phosphatases sont impliquées dans la déphosphorylation des histones : les phosphatases de type 1, 2A et 4 (*Hsu et al., 2000; Nowak and Corces, 2004; Nakada et al., 2008*).

4.3.3.5. Ubiquitylation et SUMOylation

L'ubiquitylation des histones s'effectue sur les résidus Lys (Tableau 5 p60 ; *Zhang, 2003*). L'ubiquitine est une protéine comportant 76 acides aminés. La fixation de l'ubiquitine est un mécanisme dépendant de l'ATP. Les enzymes impliquées dans sa fixation sur les histones sont celles utilisées par la cellule pour la dégradation de protéines via le protéasome (*Goldberg, 2003*), à savoir les trois enzymes E1, E2 et E3 dont l'action concertée permet l'ubiquitylation (*Wilkinson, 2000*). Alors que l'ubiquitylation d'une protéine est généralement un signe de dégradation via le protéasome, cela n'est pas le cas de l'ubiquitylation des histones. Elle semble plutôt impliquée dans l'activation de la transcription (*Nathan et al., 2003*). Contrairement aux autres modifications posttraductionnelles des histones, l'ubiquitylation ne semble pas jouer un rôle d'ancrage pour d'autres protéines, mais vu la grande taille du résidu attaché, elle est susceptible d'induire un encombrement stérique important et d'influencer les autres modifications des histones.

La SUMOylation des histones s'effectue sur l'ensemble des quatre histones formant l'octamère (Tableau 5 p60 ; *Nathan et al., 2006*). Le peptide SUMO (« small ubiquitin-related modifier ») présente 18% d'homologie avec l'ubiquitine et adopte une structure tridimensionnelle similaire (*Melchior, 2000*). De la même manière, la fixation d'un groupement SUMO sur une protéine ne signifie pas qu'elle sera dégradée via le protéasome. Les protéines SUMO, comportant environ cent acides aminés, sont encore plus encombrantes

que l'ubiquitine. Les enzymes qui fixent et hydrolysent SUMO sont similaires à celles effectuant ces réactions pour l'ubiquitine. La SUMOylation de l'histone H4 a été corrélée à une répression de la transcription (*Shiio and Eisenman, 2003*).

4.3.3.6. ADP-ribosylation

L'ADP-ribosylation des histones s'effectue sur des résidus Arg ou Glu (Tableau 5 p60 ; *Hassa et al., 2006*). Il existe deux familles d'enzymes responsables de la ribosylation : les six mono-ADP-ribosyltransférases et les cinq poly-ADP-ribosyltransférases. A cela s'ajoute le cas particulier déjà noté de deux sirtuines, SIRT4 et SIRT6, qui possèdent une activité mono-ADP-ribosyltransférase (*Liszt et al., 2005*). La réaction d'ADP-ribosylation nécessite la présence de NAD⁺ comme cofacteur. C'est cette utilisation du NAD⁺ comme cofacteur qui explique que certaines sirtuines présentent également une activité de ribosylation. La réaction enzymatique inverse est portée par des poly-ADP-ribose-glycohydrolase (*Bonicalzi et al., 2005*). La mono-ADP-ribosylation des histones est impliquée dans les processus de réparation de l'ADN (*Hassa and Hottiger, 2005*). La poly-ADP-ribosylation des histones, surtout celle de l'histone H1 impliquée dans la compaction de la chromatine, jouerait un rôle dans la relaxation de la chromatine et donc dans l'induction de la transcription (*Aubin et al., 1983*).

4.3.3.7. Biotinylation, déimination et glycoxydation

La biotinylation des histones s'effectue uniquement sur des résidus Lys (Tableau 5 p60 ; *Hassan and Zemleni, 2008*). Les enzymes responsables de la biotinylation sont des holocarboxylases synthétases et des biotinyllases (*Camporeale et al., 2006*). La biotinylation de l'histone H4 sur la Lys 12 joue un rôle dans la répression de la transcription, vu qu'elle est surtout retrouvée dans l'hétérochromatine et au niveau de télomères. En lien avec son rôle dans le maintien des télomères, la diminution de l'apport en biotine chez *D. melanogaster* entraîne une augmentation de la résistance aux stress et de l'espérance de vie (*Smith et al., 2007*).

Enfin, deux modifications posttraductionnelles des histones ont été décrites uniquement *in vitro*, et au sujet desquelles très peu de choses sont connues : la déimination (*Cuthbert et al., 2004*) et la glycoxydation par l'ADP-ribose (*Cervantes-Laurean et al., 1996*).

4.3.4. Hypothèse de l'existence d'un « code des histones »

Certains auteurs sont allés jusqu'à proposer que les modifications des histones précédemment citées constitueraient un « code », puisque selon eux, à chaque combinaison de modifications correspondrait un état particulier de condensation de la chromatine (*Strahl and Allis, 2000; Jenuwein and Allis, 2001*). Il faut d'abord constater le caractère particulièrement complexe de ce code, dont le décryptage n'en est qu'à ses prémices. Si l'objectif de ce code est de créer une correspondance entre une combinaison de modifications et l'activation ou la répression de la transcription d'un gène, on peut se demander pourquoi il serait si compliqué ; ne suffirait-il pas d'une seule combinaison pour signifier « transcription active » et d'une autre pour signifier « transcription réprimée » ? Par contre si l'objectif de ce code est d'associer à chaque combinaison de modification un degré précis de niveau de transcription, on peut se demander si cela est envisageable, car la plupart des modifications ne sont pas indépendantes les unes des autres (*Kouzarides, 2007*) et qu'une même combinaison pourrait avoir des effets distincts en fonction du promoteur sur lequel elle se trouve.

Un fait avéré est que l'abondance des modifications sur les histones rend possible une sorte de « dialogue » entre elles :

- De nombreuses modifications ont lieu sur les mêmes résidus, particulièrement la Lys (Tableau 5 p60). On constate donc une compétition entre ces modifications, vu qu'elles sont mutuellement exclusives (*Yang, 2005*).
- Bien qu'une protéine ne se fixe jamais sur un seul résidu, sa liaison peut être perturbée par la modification de résidus adjacents. Par exemple, la phosphorylation de la Ser 10 de l'histone H3 affecte la liaison de la protéine HP1 sur la Lys 9 méthylée de cette même histone H3 (*Fischle et al., 2005*).
- L'activité catalytique d'une enzyme peut être compromise par la modification de son site actif (*Kouzarides, 2007*).
- Une enzyme est susceptible de reconnaître plus facilement le substrat si l'histone est modifiée. Par exemple, la HAT GCN5 ne reconnaît l'histone H3 que lorsque celle-ci est phosphorylée sur la Ser 10 (*Clements et al., 2003*).

Une interaction a été mise en évidence également entre des modifications portées par des histones différentes. Par exemple, l'ubiquitinylation de H2B est nécessaire pour la triméthylation de la Lys 4 de l'histone H3 (*Lee et al., 2007*). Les modifications des histones et la méthylation de l'ADN ne sont pas toujours indépendantes. En effet, la méthylation de la Lys 4 de l'histone H3 à proximité d'îlots CpG, semble protéger ces derniers de la

méthylation. Ce phénomène résulte du recrutement sur des résidus acétylés de protéines telles des HDAC ou des histones méthyltransférases (*Fan et al., 2008*). Au contraire, la méthylation de la Lys 9 de l'histone H3 semble nécessaire à la méthylation de l'ADN (*Martin and Zhang, 2005*).

Si l'ensemble des modifications des histones constitue un code, alors on doit pouvoir le déchiffrer. Comment la combinaison des modifications est-elle reconnue puis traduite en un effet fonctionnel donné ? Le déchiffrement passe sans doute par l'identification de protéines reconnaissant des modifications posttranscriptionnelles précises. Certaines de ces protéines sont connues. Elles reconnaissent leur cible par des domaines protéiques spécifiques (*de la Cruz et al., 2005*). Ainsi, des protéines possédant des bromodomains reconnaissent les Lys acétylés. La méthylation des Lys est reconnue par des domaines de la famille « Royal » (chromodomaine, Tudor, MBT). La phosphorylation des Ser permet l'ancrage de protéines possédant un domaine 14-3-3 (*Kouzarides, 2007*).

4.3.5. ARN interférents et facteurs de remodelage de la chromatine dépendant de l'ATP

En plus de la méthylation de l'ADN et des modifications posttraductionnelles des histones, il existe encore d'autres mécanismes nucléaires permettant de réguler la transition entre hétérochromatine et euchromatine (Figure 15 p55). Les ARN interférents, issus de gènes non codants, mais néanmoins transcrits, jouent un rôle dans la régulation de la transcription (*Andersen and Panning, 2003*). L'exemple le mieux caractérisé est celui des ARN *Xist* et *Tsix* qui interviennent dans le processus d'inactivation du chromosome X chez la femelle de mammifère ce qui permet un dosage identique entre elle et le mâle. Ce phénomène est aléatoire : certaines cellules expriment l'ensemble des allèles maternels et d'autres l'ensemble des allèles paternels (*Chow et al., 2005*).

Une dernière catégorie de protéines, connue pour utiliser l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP pour introduire une torsion supplémentaire sur le double brin d'ADN nucléosomal, affecte l'accessibilité de la chromatine aux protéines précédemment citées (*Kingston and Narlikar, 1999*). Ceci a pour conséquence une diminution de l'accessibilité de l'ADN et des histones (*Wolffe and Hayes, 1999*). Ces protéines peuvent être regroupées en trois familles : NuRD, SWI/SNF et ISWI. Les protéines de la famille NuRD possèdent un chromodomaine ce qui leur permet d'interagir avec les histones méthylées. De la même manière, les protéines de

la famille SWI/SNF possèdent toutes un bromodomaine et peuvent donc reconnaître les histones acétylées (Narlikar *et al.*, 2002).

4.4. Transmission des marques épigénétiques

Les altérations épigénétiques peuvent se transmettre entre cellule mère et cellule fille. Il faut toutefois distinguer deux types de transmission de l'information épigénétique : celle qui a lieu durant la mitose et celle qui a lieu au moment du développement.

Au cours de la division cellulaire, les deux brins d'ADN qui sont symétriquement méthylés se séparent avant de s'associer avec des brins complémentaires néoformés et non méthylés. L'hémiméthylation transitoire est rapidement rendue symétrique par la DNMT1 (Wolffe and Matzke, 1999). Ainsi, le profil de méthylation d'un gène est maintenu au cours des divisions cellulaires. Lors de la réplication des chromosomes, les histones sont réparties entre les deux cellules filles. Les nucléosomes sont désassemblés avec le tétramère (H3/H4)₂ se séparant en deux et se répartissant entre les deux cellules filles. Les histones H2A et H2B préexistant et néosynthétisés se fixent alors sur le dimère H3/H4 (Wolffe and Hayes, 1999).

Au cours du développement, deux périodes sont caractérisées par un remaniement global de la méthylation de l'ADN : ce sont le stade de blastocyste et la gamétogenèse. Ces deux périodes débutent par une vague de déméthylation massive de l'ADN suivie d'une vague de méthylation tout aussi conséquente (Li, 2002). Elles permettent une reprogrammation globale du génome. C'est pendant la gamétogenèse que les gènes d'expression monoallélique sont méthylés. Ainsi les gamètes femelles et mâles n'auront pas le même profil de méthylation pour un gène donné. Ce phénomène d'« empreinte parentale » est nécessaire pour le développement normal de l'embryon (Rousseaux *et al.*, 2004). Une mauvaise régulation de ces mécanismes est associée à des syndromes comprenant un retard mental, tels les syndromes d'Angelman et de Prader-Willi (Lalande, 1996). Bien que les DNMT3_A et 3_B, à savoir les histones méthyltransférases *de novo*, aient été proposées pour jouer un rôle dans la mise en place du profil de méthylation, les mécanismes de méthylation lors du développement ne sont pas bien connus. La question principale qui reste en suspens est de savoir comment la cellule garde en mémoire de manière fidèle, les régions et les positions à méthyler pour conserver dans une nouvelle cellule le profil d'expression génique.

4.5. Plasticité neuronale et influence de l'environnement

La méthylation de l'ADN et les modifications des histones ne sont pas figées au cours du temps. En effet, elles évoluent sous l'influence de facteurs environnementaux tels l'apprentissage, le stress, l'alimentation, les hormones ou les agents pharmacologiques. Par exemple, ces mécanismes épigénétiques sont impliqués dans l'apprentissage et la mémorisation (*Levenson and Sweatt, 2006*). Chez le mollusque *Aplysia californica*, deux formes de plasticité persistantes sont considérées comme des modèles de mémoire : la potentialisation et la dépression à long terme. L'inhibition des HDAC augmente l'amplitude de la potentialisation à long terme (*Guan et al., 2002*). Chez les mammifères, la peur conditionnée, paradigme où l'animal apprend à associer un nouvel environnement avec un stimulus aversif, augmente l'acétylation de l'histone H3 dans l'hippocampe (*Levenson et al., 2004*). L'inhibition de la HAT CBP a pour conséquence la diminution des capacités mnésiques des animaux dans différents tests d'apprentissage : la reconnaissance d'un nouvel objet, l'apprentissage spatial dans la piscine de Morris et la peur conditionnée (*Alarcon et al., 2004; Korzus et al., 2004*). D'autre part l'inhibition des HDAC augmente les capacités mnésiques des animaux. Ces études démontrent donc que l'expérience et l'activité neuronale augmentent l'acétylation des histones.

Si les rates apportent beaucoup de soin à leurs nouveau-nés à la naissance, ceux-ci seront moins sensibles au stress à l'âge adulte (*Weaver et al., 2004; Champagne et al., 2006*). Cette observation est associée à des régulations épigénétiques. En effet, les rats bénéficiant d'une plus grande attention maternelle présentent un niveau de méthylation plus faible des promoteurs et un niveau d'acétylation plus élevé des histones entourant les gènes codant les récepteurs des glucocorticoïdes et des oestrogènes dans l'hippocampe et l'hypothalamus (*Weaver et al., 2004; Champagne et al., 2006*). L'expression différentielle des deux types de récepteurs qui en résulte entraîne une diminution de l'anxiété des rats devenus adultes. Ces mécanismes sont réversibles (*Weaver et al., 2005*).

L'influence de facteurs environnementaux s'observe très bien chez les jumeaux homozygotes. En effet, bien qu'ils disposent d'un génome parfaitement identique, certains jumeaux présentent à l'âge adulte des différences de phénotype, notamment au niveau du comportement ou dans leur susceptibilité à développer certaines pathologies (diabète ou troubles psychiatriques). Ces différences ont été corrélées à des profils de méthylation distincts de leur génome, suggérant un niveau d'expression différent de certains gènes chez l'un des jumeaux par rapport à l'autre (*Fraga et al., 2005; Haque et al., 2009*). Cette

influence environnementale a également été mise en évidence chez des personnes qui, au cours de leur enfance, ont été victimes d'un stress très important (abus sexuel, maltraitance). Ceci a pu être corrélé à la fois à une augmentation du profil de méthylation de l'ADN du promoteur du gène codant le récepteur aux glucocorticoïdes et à une diminution de l'expression de cette protéine au niveau de l'hippocampe (*McGowan et al., 2009*).

La méthylation de l'ADN et les modifications épigénétiques apparaissent comme influencées par les facteurs environnementaux tout au long de la vie. Ces modifications contribuent à l'évolution du phénotype à travers les années et suggèrent que l'épigénome, défini comme étant l'ensemble des modifications épigénétiques d'une cellule donnée, constitue une sorte de mémoire de l'expérience individuelle (*Siegmund et al., 2007*).

4.6. Modifications épigénétiques et maladies neurologiques

L'étiologie de nombreuses maladies psychiatriques comporte sans doute une composante dans laquelle intervient un dysfonctionnement des mécanismes épigénétiques. C'est par exemple le cas de la dépression pour laquelle divers modèles animaux montrent que son induction est associée à une modification du profil d'acétylation et de méthylation du promoteur du gène *BDNF*. Un stress social chez la souris augmente la diméthylation de l'histone H3, une modification induisant la répression du gène, au niveau du promoteur du gène codant le *BDNF*, d'où une sous-expression persistante de ce facteur (*Tsankova et al., 2006*). L'inhibition des HDAC par l'acide butyrique produit des effets de type antidépresseur (*Schroeder et al., 2007*). Un ensemble de syndromes, marqués sur le plan phénotypique par un retard neuro-développemental, sont dus à des dysfonctions de mécanismes de régulation épigénétiques. Tel est le cas du syndrome de Rett, associé à la mutation du gène *MECP2*, ou encore du syndrome de Rubinstein-Taybi, associé à la mutation du gène codant *CBP* (Tableau 9 ; *Tsankova et al., 2007*).

Tableau 9 : Maladies connues pour être dues à des dysfonctionnements épigénétiques

Maladies	Dysfonctionnement	Caractéristiques cliniques
Syndrome d'Angelman	Empreinte anormale par méthylation de l'ADN du chromosome maternel 15q11-13	Atrophie corticale, démyélinisation du cervelet, problèmes cognitifs
Syndrome de Coffin-Lowry	Mutation du gène <i>RSK2</i> dont la protéine interagit avec MeCP2, CBP	Maladie liée à l'X, retard psychomoteur, problèmes squelettiques et craniofaciaux
Syndrome de Prader-Willi	Empreinte anormale par méthylation de l'ADN du chromosome maternel 15q11-13	Léger retard mental, problèmes endocriniens
Syndrome de Rett	Mutation du gène <i>MECP2</i>	Maladie liée à l'X, arrêt du développement cérébral, problèmes cognitifs, comportement autistique
Syndrome de Rubinstein-Taybi	Mutation du gène <i>CBP</i>	Retard mental, caractéristiques faciales anormales, arrêt de la croissance
Syndrome du X fragile	Hyperméthylation des promoteurs des gènes <i>FMR1</i> et <i>FMR2</i>	Maladie liée à l'X, comportement autistique, macrocéphalie, visage étroit et allongé avec de grandes oreilles, hypotonie

4.7. Modifications épigénétiques et drogues

Les mécanismes par lesquels l'exposition chronique aux drogues converge vers le génome, afin de modifier la transcription de certains gènes, restent mal connus. Des travaux récents suggèrent que certaines drogues induisent des modifications directes de la structure de la chromatine. De même, l'inhibition de certaines enzymes de remodelage de la chromatine altère les effets comportementaux induits par la cocaïne.

Dans un article paru en 2005, Li et ses collègues ont montré pour la première fois que l'inhibition des HDAC pouvait altérer les effets comportementaux induits par la cocaïne. Ainsi, chez des souris, l'acide valproïque, une HDACi de la classe des acides gras à courte chaîne aliphatique, n'a pas d'effet sur l'hyperlocomotion induite par la cocaïne, mais bloque en fonction de la dose la mise en place de la sensibilisation comportementale, sans pour autant bloquer l'expression de cette sensibilisation (*Li et al., 2005*).

La même année, Kumar et ses collègues ont montré que la cocaïne modifiait le profil d'acétylation des histones au niveau des promoteurs des gènes *c-Fos*, *FosB* et *BDNF*. En particulier, une injection unique de cocaïne à des rats accroît l'acétylation de l'histone H4 et la phospho-acétylation de l'histone H3 au niveau du promoteur du gène *c-Fos* ainsi que

l'acétylation de l'histone H4 au niveau du promoteur du gène *FosB*. Sur le plan comportemental, l'inhibition des HDAC par l'acide butyrique n'a pas modifié l'hyperlocomotion induite par la cocaïne, mais s'est avérée potentialiser la mise en place de la sensibilisation comportementale (*Kumar et al., 2005*).

Dans un article paru en 2006, notre équipe a montré pour la première fois que chez des rats, l'injection de cocaïne en intrapéritonéal (i.p.) pendant dix jours augmentait l'expression des protéines de liaison à l'ADN méthylé MeCP2, MBD1 ainsi que de HDAC2 dans des neurones du CPF et du CPu. Dans ces mêmes structures, ces injections chroniques induisirent une diminution de l'acétylation des Lys 9 et 14 de l'histone H3 (*Cassel et al., 2006*).

A mon arrivée au sein de l'équipe « Psychostimulants et Processus Neuroadaptatifs » en 2006, étant donné que la technique d'AA de cocaïne chez le rat était disponible au laboratoire, nous avons décidé de tester dans un premier temps l'effet de différents HDACi dans ce paradigme. Dans notre démarche, il nous semblait primordial de vérifier si les régulations épigénétiques intervenaient dans les effets comportementaux de la cocaïne, avant de poursuivre les études de l'effet de la cocaïne sur les mécanismes de régulation épigénétique au niveau moléculaire.

A partir de là s'est construit le plan de ma thèse, qui va consister tout d'abord en une analyse comportementale des conséquences de l'inhibition des HDAC sur l'AA de cocaïne et de sucrose, sur la sensibilisation comportementale induite par la cocaïne et sur la CPP induite par la nicotine. Il se poursuivra par une analyse biochimique des effets des HDACi sur l'expression de facteurs de régulation épigénétique chez des animaux s'auto-administrant de la cocaïne et s'achèvera par une recherche de gènes contrôlés par des mécanismes épigénétiques et pouvant expliquer les effets des HDACi sur les propriétés renforçantes de la cocaïne.

B. Résultats Expérimentaux

1. Publication n°1

Histone Deacetylase Inhibitors Decrease Cocaine But Not Sucrose Self-Administration in Rats

Pascal Romieu, Lionel Host, Serge Gobaille, Guy Sandner, Dominique Aunis, Jean Zwiller

The Journal of Neuroscience, 2008

(PR and LH contributed equally to this work)

Les résultats des études, présentés dans cet article, montrent que l'injection intraveineuse (i.v.) des inhibiteurs de HDAC (HDACi) trichostatine A (TsA) ou phénylbutyrate (PhB) réduisent, en fonction de la dose, l'auto-administration (AA) de cocaïne dans un protocole de ratio fixe 1 (FR1). En ratio progressif (PR), la TsA, mais aussi la dépuécine (injectée en intracérébroventriculaire ; i.c.v.) diminuent le point de rupture atteint par les rats. Ainsi l'inhibition des HDAC diminue les propriétés appétitives de la cocaïne ainsi que la motivation des animaux à la consommer. Par ailleurs, l'inhibition des HDAC n'a pas d'effet sur l'AA du renforçant naturel qu'est le saccharose. Cette observation a pu être corrélée avec des mesures d'activité enzymatique des HDAC, celle-ci étant inhibée dans le CPF en réponse à l'AA de cocaïne, mais pas à celle de saccharose. Un ensemble d'expériences contrôles permet d'affirmer que la diminution de la motivation pour la cocaïne n'est pas attribuable à de l'anhédonie vu que la TsA n'a aucun effet sur le test de préférence à l'eau sucrée. Ces observations ne sont pas non plus attribuables à un dysfonctionnement global de la locomotion des animaux, car la TsA n'a aucun effet sur l'activité exploratoire basale des rats, ni sur l'hyperlocomotion induite par la cocaïne. Par contre, la TsA bloque complètement la sensibilisation comportementale induite par cette drogue. L'ensemble de nos données montre que dans le cerveau adulte de rat, les régulations épigénétiques de la transcription des gènes influencent un comportement aussi complexe que la motivation à consommer de la drogue.

Histone Deacetylase Inhibitors Decrease Cocaine But Not Sucrose Self-Administration in Rats

Pascal Romieu,^{1,4*} Lionel Host,^{1,4*} Serge Gobaille,^{2,4} Guy Sandner,^{3,4} Dominique Aunis,^{1,4} and Jean Zwiller^{1,4}

¹Inserm, U575, Centre de Neurochimie, 67084 Strasbourg, France, ²Institut Fédératif de Recherche 37 Neurosciences, 67085 Strasbourg, France, ³Inserm, U666, 67085 Strasbourg, France, and ⁴Université Louis Pasteur, 67084 Strasbourg, France

Regulation of gene expression is known to contribute to the long-term adaptations taking place in response to drugs of abuse. Recent studies highlighted the regulation of gene transcription in neurons by chromatin remodeling, a process in which posttranslational modifications of histones play a major role. To test the involvement of epigenetic regulation on drug-reinforcing properties, we submitted rats to the cocaine operant self-administration paradigm. Using the fixed ratio 1 schedule, we found that the histone deacetylase (HDAC) inhibitors trichostatin A and phenylbutyrate dose-dependently reduced cocaine self-administration. Under the progressive ratio schedule, both trichostatin A and depudecin significantly reduced the breaking point, indicating that HDAC inhibition attenuated the motivation of rats for cocaine. Conversely, HDAC inhibition did not decrease self-administration for the natural reinforcer sucrose. This observation was correlated with measurements of HDAC activity in the frontal cortex, which was inhibited in response to cocaine, but not to sucrose self-administration. Control experiments showed that the decrease in the motivation for the drug was not attributable to a general motivational dysfunction because trichostatin A had no adverse effect on locomotion during the habituation session or on cocaine-induced hyperlocomotion. It was not attributable to anhedonia because the inhibitor had no effect on the sucrose preference test. In contrast, trichostatin A completely blocked the cocaine-induced behavioral sensitization. Together, the data show that epigenetic regulation of gene transcription in adult brain is able to influence a motivated behavior and suggest that HDAC inhibition may counteract the neural sensitization leading to drug dependence.

Key words: cocaine; sucrose; epigenetic; histone modification; self-administration; addiction

Introduction

Drug dependence is currently viewed as a chronic brain disease characterized primarily by a compulsive drug-seeking and drug-taking behavior. The development of dependence to drugs of abuse occurs over time and requires cellular adaptations. One area of intensive research aimed at identifying the long-term adaptations is the regulation of changes in gene expression evoked by the drugs (Nestler, 2001). For instance, cocaine administration has been shown to elicit induction in neurons of several immediate early genes that encode transcription factors (Hope et al., 1992; Moratalla et al., 1992; Bhat and Baraban, 1993; Humblot et al., 1998; Jouvert et al., 2002). Although much of the work has focused on these factors often considered to be molecular switches that coordinate changes in gene expression underlying neuronal plasticity, the molecular mechanisms which control expression of genes, referred to as epigenetic mechanisms, have been under appreciated in the nervous system. Recent studies highlighted the importance in neurons of chromatin remodeling

in controlling gene transcription and revealed that complex mechanisms regulate the accessibility of genes to the transcriptional machinery (Colvis et al., 2005). Access to DNA in the nucleosome is achieved via complex associations of proteins in which posttranslational modifications of histones play a major role. In general, increased histone acetylation is associated with DNA relaxation and elevated transcriptional activity, whereas decreased acetylation brought about by histone deacetylases (HDACs) and methyl-CpG-binding proteins such as MeCP2 results in tighter DNA coiling and gene silencing (López-Rodas et al., 1993; Jenuwein and Allis, 2001; Turner, 2002).

We demonstrated that repeated injections of cocaine as well as of the antidepressant fluoxetine regulate chromatin remodeling by inducing the methyl-CpG-binding proteins MeCP2 and MBD1 in rat striatum and frontal cortex (Cassel et al., 2006). The data suggest that an epigenetic regulation mechanism of gene transcription could be involved in the behavioral long-term effects elicited by cocaine. To test the hypothesis, we treated rats with HDAC inhibitors and submitted them to the intravenous cocaine operant self-administration paradigm. The effects of chromatin remodeling on cocaine-taking behavior were compared with those observed during self-administration of sucrose, a natural reinforcer. We used the fixed ratio (FR) schedule, in which rats have to produce a fixed number of nose-pokes (NPs) into a hole to obtain a cocaine or sucrose infusion. Although this experiment measures the reinforcing properties of the com-

Received Jan. 28, 2008; revised July 23, 2008; accepted July 23, 2008.

We gratefully acknowledge resources provided by the Institut de Recherches Scientifiques sur les Boissons and the support of the Société Française d'Alcoolologie.

*P.R. and L.H. contributed equally to this work.

Correspondence should be addressed to Pascal Romieu, Inserm U575, Centre de Neurochimie, 5 rue Blaise Pascal, 67084 Strasbourg Cedex, France. E-mail: romieu@neurochem.u-strasbg.fr.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.0379-08.2008

Copyright © 2008 Society for Neuroscience 0270-6474/08/289342-07\$15.00/0

pounds, the evaluation of the motivation of animals for a given compound is assessed by the progressive ratio (PR) schedule, in which the self-administration task is rendered more difficult, because the number of NPs required for an infusion increases progressively (Depoortere et al., 1993; Arnold and Roberts, 1997).

Materials and Methods

Animals

Male Wistar rats (Janvier), weighing 160–180 g, were housed in standard home cages (five rats per cage), under an inverted 12 h light/dark cycle (lights on at 7:00 P.M.), with water available from two bottles. Animals had *ad libitum* access to food and water, unless indicated otherwise. After surgery for catheter implantation into the jugular vein, animals were housed individually so that acoustic, olfactory, and visual social contacts remained possible. They were allowed to recover for 5–7 d before the beginning of behavioral tests which were conducted during the dark period. Each of the specific behavioral tests was performed using distinct groups of rats. All procedures involving animal care were conducted in compliance with current laws and policies (Council directive 87848, Service Vétérinaire de la Santé et de la Protection Animales).

Pharmacological treatment

Cocaine hydrochloride (Sigma-Aldrich) solution was adjusted with 0.9% NaCl to infuse an intravenous dose of 0.33 mg/kg/injection for self-administration and 1 mg/kg for locomotor activity. Trichostatin A (TsA; Sigma-Aldrich), sodium 4-phenylbutyrate (Fluka, Sigma-Aldrich), depudecin (Sigma-Aldrich) or 10% DMSO vehicle solution were administered 30 min before the beginning of the self-administration session. TsA and phenylbutyrate were injected intravenously, whereas depudecin was administered intracerebroventricularly.

Surgery

Intravenous catheterization procedure was performed as described previously (Caine et al., 1993). Rats were anesthetized by the intraperitoneal injection (1 ml/kg) of a 5:1 (v/v) mixture containing 0.1 g/ml ketamine (Imalgene 1000) and 2% xylazine (Rompun; Centravet), before surgical implantation of a chronic indwelling catheter in the right jugular vein. The catheter, which consisted of SILASTIC tubing 12 cm long [0.3 mm inner diameter (i.d.) × 0.63 mm outer diameter (o.d.)] (SILASTIC; Plastics One), was fitted to a 22 gauge guide cannula (Plastics One) that was bent at a right angle and then embedded in dental cement on a circular 2.5 cm mercylene mesh base. A discrete incision was performed onto the jugular vein; the heparinized catheter was immediately inserted 3.6 cm into the vein and anchored with suture. Catheters were flushed daily with 150 μ l of a solution mixture containing 300 U/ml heparin and 0.1 g/ml ampicillin to prevent clotting and infection.

Cocaine operant self-administration

Apparatus. Studies were conducted in dark operant chambers (30 × 30 × 30 cm) located in a sound-attenuated room. A single channel fluid swivel (Instech Laboratories) was mounted on a balanced arm above each chamber. A computer-driven syringe pump (Imetronic) activated a 5 ml syringe and pushed fluid into SILASTIC tubing (0.63 mm i.d. × 1.19 mm o.d.) connected to the rat through its externalized 22 gauge guide cannula. Each chamber was equipped with two 3 cm-diameter holes on the same wall, located 4 cm above the floor; one was selected as the active hole for delivering the reinforcer and the other as the inactive hole. They were counterbalanced between right and left position in the various groups of rats. Disruption of an infrared photobeam in each hole was detected using a digital input card (DIO-24; National Instruments) and home made LabView software (National Instruments). NPs into both holes were recorded. NPs into the inactive hole had no programmed consequence. When the number of NPs into the active hole was reached, a 40 μ l cocaine solution was delivered >2 s under the control of the computer. A stimulus light, located 20 cm above the active hole, was paired contingently with the delivery of cocaine and persisted during a 40 s time-out period.

Drug self-administration procedure. For cocaine self-administration procedure (LeSage et al., 1999), rats were first submitted to an FR1 sched-

ule of reinforcement during daily 2 h sessions for 7 d. In this schedule, each NP into the active hole triggered an intravenous infusion of cocaine solution. No cutoff was applied concerning the number of self-infusions the rat was able to perform during the session. The day after the seventh FR1 session, rats were submitted to a PR schedule, in which the NPs required to earn an injection escalated according to the following exponential equation (Richardson and Roberts, 1996), where n is the rank number of successive injections: $NP_{(n)} = [5 \cdot e^{0.2 \cdot n}] - 5$.

The PR schedule was performed for 7 consecutive daily sessions. Each session lasted for 5 h or until animals did not achieve the ratio for delivery of an injection within 1 h. The breaking point to extinguish self-administration behavior was determined in each animal.

Sucrose operant self-administration

Apparatus. Studies were conducted in the same chambers than those used for cocaine self-administration. A window (4 × 4 cm; bottom at 4 cm above the floor) located on the wall adjacent to the active hole allowed the rat to drink a sucrose solution from a container placed outside the chamber. When the number of required NPs into the active hole was achieved, 300 μ l of a 10% sucrose solution were delivered into the container over a 3 s period through a syringe controlled by a computer-driven pump.

Sucrose self-administration procedure. Rats were submitted to FR1 and PR sessions, as described for cocaine self-administration. Two days after surgery for catheter implantation, rats were submitted to a 48 h period of exposure to 4% sucrose solution to habituate to it. Tap water was then substituted for the sucrose solution. Seven days after surgery, rats were submitted to water deprivation for 20 h and were then placed for 1 h in the operant chamber with the container holding 2 ml of a 10% sucrose solution. At the end of the shaping session, rats were returned to home cages and were free to drink tap water for 4 h, after which the procedure was repeated once. An operant conditioning session, without any treatment, began under FR1 the day after the second shaping session and allowed to split the rats into two balanced groups. Pharmacological treatment, followed by operant conditioning session, began the next day.

Sucrose preference test

Three weeks after their arrival in the laboratory, rats were submitted to a 48 h period during which a 1% sucrose solution was the only fluid available. Fluid was available from two bottles throughout the experiment. Rats were then housed individually, with the sucrose solution being available for another day, followed by a 3 d period during which water was substituted for sucrose. They were pretested for sucrose preference on the following day. Rats were placed individually in test cages, first with no access to fluid for 3 h, and then with access to the two bottles, one containing tap water and the other a 1% sucrose solution. Fluid intake was measured by weighing the bottles after a 60 min period in the test cage and percentage of sucrose preference was calculated (volume of sucrose intake × 100/total fluid intake). Rats were returned to their home cage with tap water available *ad libitum*, and 2 d later they underwent surgery for catheter implantation as described above. After a 3 d recovery period, they were injected daily for 3 d with TsA (0.3 mg/kg, i.v.) or vehicle. On the following day, animals were tested again for sucrose preference 30 min after the fourth TsA injection.

Locomotor activity

To measure spontaneous locomotor activity, rats were placed individually in Plexiglas cages (base 30 × 45 cm; height 35 cm). The floor was covered with sawdust and a passive infrared detector (IRP124; Talco) was placed above the cage behind a Fresnel lens which divides the cage into sectors. The detector was controlled by a home made Labview Software (National Instruments). It recorded the number of times the rat crossed limits of a beam every 5 min. Rats were treated daily with TsA (0.3 mg/kg) or vehicle for 4 d. Thirty minutes after the last injection, they were placed into the test cage (the cage being a new environment for them), and locomotor activity was recorded for 2 h. For measurement of cocaine-induced hyperlocomotor activity, rats were given an intravenous cocaine injection after a 90 min habituation session in the test chamber, and locomotor activity was monitored over the next 90 min period. This treatment was repeated each day during 5 d, and locomotor activity was recorded again after a 6 d drug-free period.

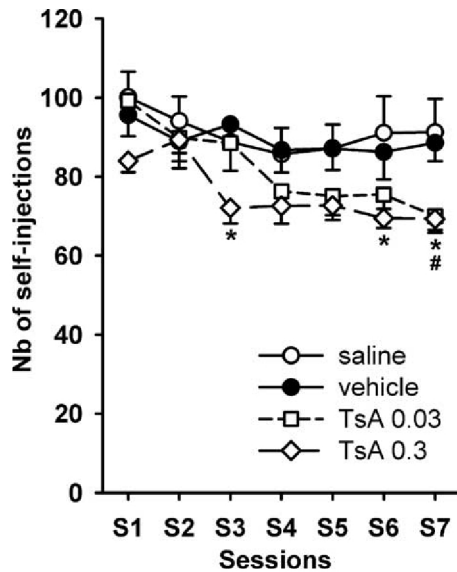


Figure 1. Effect of TsA on cocaine self-administration (0.33 mg/kg/infusion) under the FR1 schedule of reinforcement. TsA or vehicle (10% DMSO) was administered intravenously 30 min before the beginning of each cocaine self-administration session. The number of self-injections reached during 2 h daily sessions is expressed as mean \pm SEM. Control ($n = 10$), vehicle-treated ($n = 12$), 0.03 mg/kg TsA-treated ($n = 13$), and 0.3 mg/kg TsA-treated ($n = 10$) groups of rats were studied. * $p < 0.05$, comparison between vehicle-treated and 0.3 mg/kg TsA-treated groups; # $p < 0.05$, comparison between vehicle-treated and 0.03 mg/kg TsA-treated groups (ANOVA and Student–Newman–Keuls *post hoc* test). Nb, Number.

HDAC assay

Total nuclear HDAC activity was measured by using the Fluor de Lys assay system (BIOMOL). After treatment, rat prefrontal cortex (FCx) and nucleus accumbens (NAc) were dissected and homogenized in 20 mM HEPES buffer, pH 7.9, containing 0.1 M KCl, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM dithiothreitol, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 20% glycerol. The homogenate was centrifuged at $1000 \times g$ for 20 min at 4°C, and HDAC activity was assayed in the pellet resuspended in the same buffer. Assays were conducted at 30°C for 20 min in a reaction mixture (50 μ l total volume) containing 50 mM Tris/Cl buffer, pH 8.0, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 250 μ M acetylated lysine side chain substrate, and 20 μ g of protein extract. Enzymatic reaction was stopped by the addition of 50 μ l of a 2 μ M TsA solution and fluorescence was generated from deacetylated substrate by the addition of a fluorescence developer. After 15 min, the fluorescence produced was measured in a 96-well fluorescence plate reader (MicroLumat Plus LB; excitation, 380 nm; emission, 460 nm). Deacetylase activity was expressed as arbitrary fluorescence units per min per mg of protein.

Statistical analysis

Results are expressed as means \pm SEM. Effects of the HDAC inhibitors during the totality of the FR sessions and for the three last PR sessions, as well as on the locomotor activity during cocaine-induced sensitization, were analyzed by two-way ANOVA (treatment and session as factors of variation) between groups of rats. Effects on HDAC activity measurements and on locomotor activity on the first day of sensitization were analyzed by one-way ANOVA (treatment as factor of variation). Student–Newman–Keuls *post hoc* tests were performed when required, and significance was set at $p \leq 0.05$.

Results

Effect of HDAC inhibitors on cocaine self-administration

When trained during daily 2 h sessions of cocaine self-administration under the FR1 schedule of reinforcement, saline-treated rats and rats treated with 10% DMSO (vehicle) displayed a stable level of cocaine intake after 3 sessions (Fig. 1). Using a cocaine dosage of 0.33 mg/kg/infusion, rats self-administered

~90 injections. Number of cocaine self-infusions was very similar whether animals were injected intravenously with saline or vehicle, showing that the vehicle solution did not affect the self-administration behavior. It is noteworthy that rats that self-administered cocaine after being injected with saline or vehicle directed >80% of the NPs onto the active hole (data not shown). Daily intravenous administration of TsA 30 min before the beginning of the self-administration session resulted in a significant reduction in cocaine intake ($F_{(3,314)} = 11.4$; $p < 0.001$). The lower dose of 0.03 mg/kg TsA produced a statistically significant decrease in cocaine self-injections only in session 7 (Fig. 1). The higher dose of 0.3 mg/kg TsA produced a statistically significant effect as early as in session 3, for which a 23% reduction in self-injections was observed, but it did not reach statistical significance on the subsequent sessions 4 and 5. The statistical significance was met for sessions 6 and 7. When the animals, once showing reduced cocaine self-administration, were subjected to further FR1 sessions but without previous TsA injection, a decrease in cocaine intake could still be noticed. After 2 consecutive daily sessions without TsA injection, rats still self-injected significantly less cocaine than control animals, suggesting that some stable mechanism was instated in response to repeated transitory HDAC inhibition (data not shown).

After 7 sessions of FR1 schedule, rats were submitted to daily sessions under a PR schedule of reinforcement, in which NPs required for drug delivery followed an exponential ascending equation. Because the PR schedule required several self-administration sessions for the rat to display a stable behavior, only the 3 last sessions (sessions 5–7) were taken into consideration for statistical analysis. Similarly to what we found under the FR1 schedule, no difference in the number of cocaine self-infusions was observed between rats treated with saline or vehicle under the PR schedule (data not shown). Animals treated intravenously with 0.03 or 0.3 mg/kg TsA 30 min before the beginning of each session reached a statistically significant lower breaking point than vehicle-treated animals ($F_{(3,86)} = 22.9$; $p < 0.001$). Figure 2*a* shows the decrease in the breaking point, expressed as the number of self-injections reached within a session, during the three last sessions. During the last session, treatment with 0.3 mg/kg TsA reduced the breaking point from 25 to 21 self-injections. The reducing effect of TsA treatment on drug intake was more manifest when expressed as the number of NPs the rat achieved to obtain the last injection. During the last session, vehicle-treated animals performed 764 NPs into the active hole, whereas this number decreased drastically to 340 for rats treated with the higher TsA dose (data not shown) ($F_{(3,86)} = 16.1$; $p < 0.001$). The effect can also be illustrated by expressing the total number of NPs performed by the rat during the entire session ($F_{(3,86)} = 16.1$; $p < 0.001$). Although vehicle-treated rats performed 4090 total cumulated NPs, this number decreased to 1774 when considering rats treated with 0.3 mg/kg TsA (Fig. 2*b*). It is noteworthy that TsA had a similar effect on the last PR sessions when the previous FR1 sessions were conducted in the absence of TsA treatment (data not shown).

We compared the effects of TsA to those produced by phenylbutyrate and depudecin, two compounds that belong to distinct groups of HDAC inhibitors. Daily intravenous administration of phenylbutyrate 30 min before the self-administration sessions resulted in a dose-dependent decrease in cocaine intake under the FR1 schedule. Although the lower dose of 2 mg/kg produced no statistical significant decrease in cocaine intake, the higher dose of 20 mg/kg phenylbutyrate produced a reduction that was statistically significant from session 5, for which a 26% reduction in

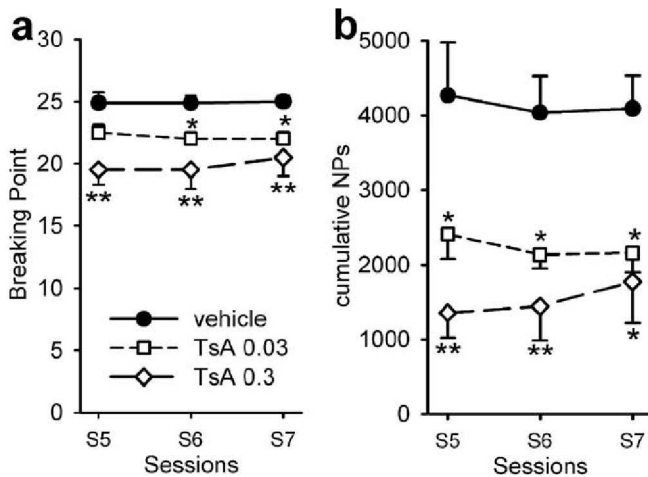


Figure 2. Effect of TsA on cocaine self-administration (0.33 mg/kg/infusion) under a PR schedule of reinforcement. PR sessions directly followed the FR sessions, and treatment of rats was as described in Figure 1. *a*, Breaking point achieved, expressed as number of self-injections; *b*, cumulative number of NPs performed by the rat to reach the breaking point. Results are expressed as means \pm SEM. Vehicle-treated ($n = 8$), 0.03 mg/kg TsA-treated ($n = 4$), and 0.3 mg/kg TsA-treated ($n = 7$) groups were studied. Results of the control saline-treated group ($n = 10$), which did not differ from those of the vehicle group are not shown but were taken into account for statistical analysis. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, comparison between vehicle-treated and TsA-treated groups (ANOVA and Student–Newman–Keuls *post hoc* test).

self-injections was observed (supplemental Fig. S1, available at www.jneurosci.org as supplemental material). In contrast, the daily intracerebroventricular administration of 20 nmoles depeucecin 30 min before the self-administration session did not significantly affect cocaine self-administration under the FR1 schedule, but it significantly decreased the breaking point reached during the PR sessions from 25 to 20 cocaine self-injections, similarly to TsA (supplemental Fig. S2, available at www.jneurosci.org as supplemental material).

Effect of TsA on HDAC activity

To ascertain that our protocol of intravenous injection of TsA was adequate for inhibiting brain HDAC activities, we measured total nuclear HDAC enzymatic activity in the FCx and NAc of rats treated with TsA. Figure 3 shows that daily injection of 0.3 mg/kg TsA for 4 d resulted in a significant decrease, by $\sim 40\%$, of total HDAC activity (FCx: $F_{(5,39)} = 15.4, p < 0.001$; NAc: $F_{(5,39)} = 5.9, p < 0.01$). A very similar decrease was observed in both structures when rats were treated for 3 d with an intraperitoneal injection of cocaine 30 min after the TsA treatment, the animals being killed 30 min after the TsA treatment on day 4. A comparable inhibition was noticed when the rats were submitted for 3 d to FR1 sessions of cocaine self-administration 30 min after each TsA treatment, the animals also being killed 30 min after the fourth TsA treatment.

Effect of TsA on the cocaine-induced locomotor activity

We next investigated whether the decrease in the motivation of the animals to self-administer cocaine resulted, at least partially, from an effect of TsA on their locomotor activity. No significant difference was observed in locomotor activity during a 2 h habituation period between groups of rats treated daily for 4 d with TsA or vehicle, the test being performed 30 min after the last injection (data not shown). When rats were injected with cocaine 30 min after the last TsA injection, an important hyperlocomotion was observed, which did not differ between the TsA- and the

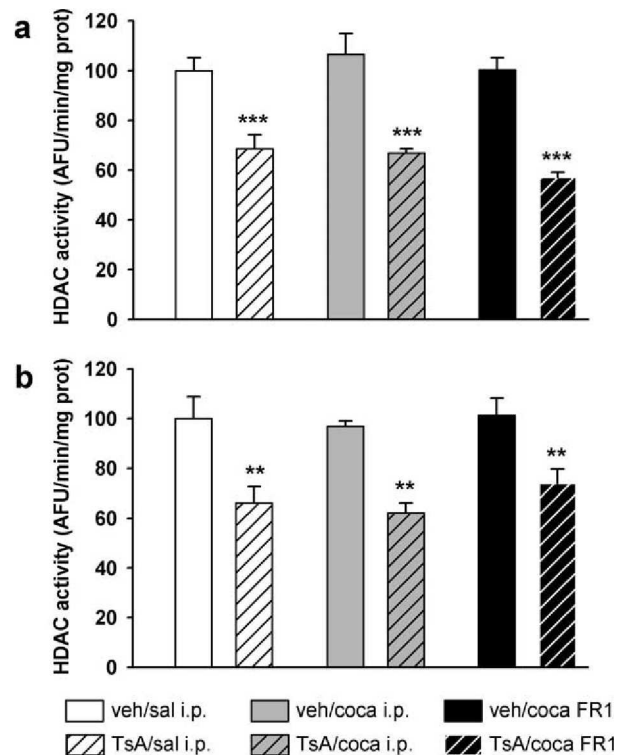


Figure 3. *a, b*, Effect of TsA on nuclear HDAC activity in the FCx (*a*) and NAc (*b*). TsA (0.3 mg/kg) or vehicle (veh) (10% DMSO) were administered intravenously daily for 4 d. Intraperitoneal injections [0.9% NaCl (sal) or 30 mg/kg cocaine (coca)] were injected daily during 3 consecutive days, 30 min after the TsA or vehicle injection. Other groups of rats were submitted to FR1 cocaine (0.33 mg/kg/injection) self-administration for 3 daily sessions beginning 30 min after the TsA injection. Rats were killed and the brain structures dissected 30 min after the fourth TsA injection (i.e., 24 h after the last cocaine administration). Total HDAC activity was assayed in the nuclear fraction prepared from each structure, using a fluorescent activity assay. Results are expressed as a percentage of saline-treated control, as means \pm SEM ($n = 6–9$ per group). ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$, comparison to saline-treated group (ANOVA followed by Student–Newman–Keuls multiple comparisons test). AFU, Arbitrary fluorescence units; prot, protein.

vehicle-treated groups of rats (Fig. 4*a*). The intravenous injection protocol (0.3 mg/kg TsA followed 30 min later by 1 mg/kg cocaine) was repeated daily for 5 d. Control rats, as expected, responded to the successive cocaine treatments by a locomotor sensitization that was statistically significant from day 4, whereas the TsA-treated animals did not show such an increased behavioral response during consecutive cocaine administration (Fig. 4*b*). When tested again at day 11, the behavioral sensitization was stable in control animals and was still completely absent in TsA-treated rats ($F_{(1,83)} = 28.6; p < 0.001$).

Effect of TsA on sucrose self-administration

We then checked whether the inhibition of HDAC activity in rat brain did affect their self-administration behavior toward the natural reinforcer sucrose. We used a very similar protocol than that used for cocaine administration, except that the rat had a sucrose solution to drink instead of receiving an intravenous drug infusion. During daily 2 h sessions of sucrose self-administration under the FR1 schedule, rats displayed a very stable level of sucrose intake during the 7 sessions. Daily intravenous administration of 0.3 mg/kg TsA 30 min before the beginning of the self-administration session did not modify the sucrose intake behavior throughout the 7 sessions, when compared with rats that received vehicle (data not shown).

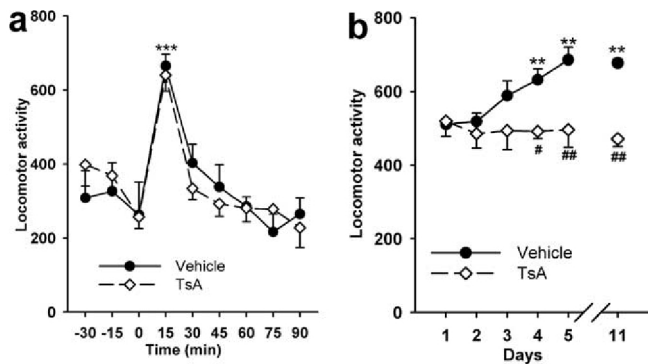


Figure 4. Effect of TsA on cocaine-induced locomotor activity. *a*, Two groups of rats were given intravenous injections of TsA (0.3 mg/kg) or vehicle (10% DMSO) daily for 4 d. Thirty minutes after the fourth injection, both groups of rats were treated intravenously with 1 mg/kg cocaine (time 0). Locomotor activity was expressed over 15 min periods. *b*, The intravenous injection protocol (0.3 mg/kg TsA followed 30 min later by 1 mg/kg cocaine) was repeated daily for 5 d. On day 11, only cocaine was administered. Locomotor activity was expressed over 10 min periods. Each point represents the mean \pm SEM ($n = 6$, vehicle-treated group; $n = 8$, TsA-treated group) of crossings. $^{\#}p < 0.05$; $^{**}p < 0.01$ and $^{***}p < 0.001$. *Significance when comparing each value to that obtained at time 0 in *a* or at day 1 in *b*; $^{\#}$ significance when comparing TsA group to vehicle group (ANOVA followed by Student–Newman–Keuls multiple comparisons test).

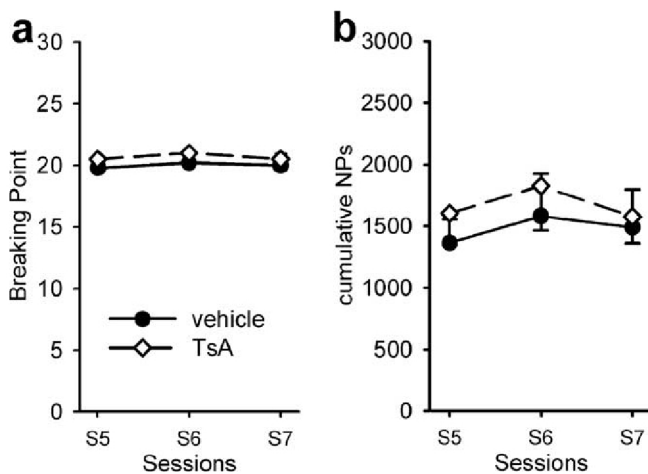


Figure 5. Effect of TsA on sucrose self-administration under a PR schedule of reinforcement. PR sessions directly followed the FR sessions, and treatment of rats was as described in legend to Figure 5. *a*, Breaking point achieved, expressed as number of sucrose solutions delivered; *b*, cumulative number of NPs performed by the rat to reach the breaking point. Results are expressed as means \pm SEM ($n = 5$ per group).

After 7 sessions of FR1 schedule, rats were submitted to daily sessions of sucrose intake under the PR schedule, which was identical to that used for estimating the motivation of rats for cocaine. Vehicle-treated control animals reached a breaking point of ~ 20 sucrose solutions delivered during each of the 3 last sessions (Fig. 5*a*) which was rather remarkable when compared with the 25 injections attained when cocaine was available. Surprisingly, the treatment with 0.3 mg/kg TsA was not found to modify the motivation of the animals for the natural reinforcer sucrose. Consequently, the total number of NPs performed by the rat during the entire session (~ 1500) was not different between the TsA- and the vehicle-treated group (Fig. 5*b*).

Because the self-administration experiments showed that HDAC inhibition did not decrease the motivation of rats for sucrose, whereas decreasing that for cocaine, we next investigated whether TsA would instead modify the hedonic aspect of the

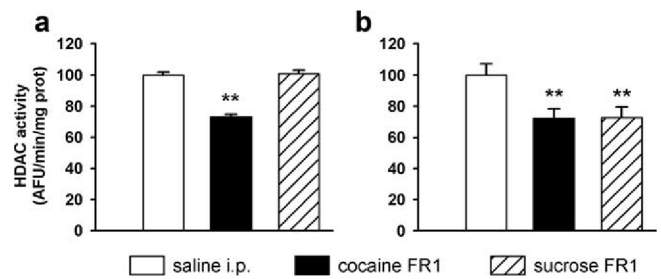


Figure 6. *a, b*, Effect of cocaine or sucrose self-administration on nuclear HDAC activity in the FCx (*a*) and NAc (*b*). Rats were submitted to 10 daily self-administration sessions for cocaine (0.33 mg/kg/infusion, i.v.) or sucrose (delivery of 300 μ l of a 10% sucrose solution) under the FR1 schedule, or to daily injections of 0.9% NaCl (saline). Two hours after the end of the last session or last injection, rats were killed and the brain structures dissected. Total HDAC activity was assayed in the nuclear fraction prepared from each structure, using a fluorescent activity assay. Results are expressed as a percentage of saline-treated control, as means \pm SEM ($n = 7$ per group). $^{**}p < 0.01$, comparison to saline-treated group (ANOVA followed by Student–Newman–Keuls multiple comparisons test). AFU, Arbitrary fluorescence units; prot, protein.

reward for sucrose. The sucrose preference test performed 30 min after the last of four daily injections with TsA indicated that the HDAC inhibitor did not decrease the volume of sucrose solution ingested. In effect, the TsA-treated rats drank 10.0 ± 2.0 ml of the sucrose solution during the test, compared with 9.7 ± 1.7 ml for the control vehicle-treated group. TsA was thus not found to affect the sucrose preference over water which was 81 ± 3 and $78 \pm 4\%$ for control and TsA-treated groups, respectively.

Comparative effect of cocaine and sucrose on HDAC activity

Because the HDAC inhibitor regulated self-administration behavior for a drug of abuse and not for a natural reward, we searched whether the compounds would by themselves differentially modify brain HDAC enzymatic activity. Figure 6 shows that total HDAC activity from nuclear fractions was found to change when rats were submitted to 10 daily self-administration sessions for cocaine or sucrose (FCx: $F_{(2,20)} = 32.9, p < 0.001$; NAc: $F_{(2,20)} = 5.5, p < 0.01$). Interestingly, in the FCx, HDAC activity was significantly inhibited by the repeated cocaine intake but not by sucrose ingestion (Fig. 6*a*). However, total HDAC activity was similarly inhibited by both compounds in the NAc (Fig. 6*b*). Because the protocol used here differed markedly from that used in Figure 3 (namely in the number of self-administration sessions and in the delay after which animals were killed), results from Figures 3 and 6 are not comparable. The results suggest that the differential effect of TsA on cocaine and sucrose intake may be related with the different levels of HDAC enzymatic activities reached in discrete brain structures during treatment with the two reinforcers.

Discussion

The present study shows that injection of HDAC inhibitors to rats was sufficient to decrease the motivation of the animals to self-administer cocaine but not sucrose. Histone acetylation/deacetylation mechanisms control modifications of chromatin structure that results in the regulation of gene transcription. It is generally thought that by removing acetyl groups from histones, HDAC enzymatic activity leads to gene repression through chromatin condensation. In mammalian cells, the HDACs are divided into four classes that depend on their structural homology to yeast deacetylases, expression pattern, and catalytic mechanisms (de Ruijter et al., 2003). The active site of class I and II HDACs is found within a conserved catalytic domain containing a zinc cat-

ion, and most HDAC inhibitors function by displacing the cation. Inhibition of HDAC activity results in a general hyperacetylation of histones which is followed by the transcriptional activation of certain genes. We used three compounds that belong to distinct groups of inhibitors: TsA, a member of the hydroxamate group of HDAC inhibitors which displays an *in vitro* IC₅₀ in the nanomolar range (Yoshida et al., 1990); depudecin, from the cyclic tetrapeptide group which has an affinity in the micromolar range (Kwon et al., 1998); and phenylbutyrate, from the group of aliphatic acids, displaying an affinity in the micromolar range (Butler and Bates, 2006). The inhibitors show no selectivity for particular members of class I or II HDACs (Butler and Bates, 2006).

To test the involvement of the chromatin architecture opening in drug reinforcement, we submitted rats to cocaine and sucrose operant self-administration paradigm. Because the procedure is based on an operant conditioning in which the animal itself regulates drug exposure, it has a good construct as well as appealing validity toward drug consumption in humans (Sanchis-Segura and Spanagel, 2006). Using the FR1 schedule, we found that TsA dose-dependently reduced the cocaine self-administration behavior. Notably, the reduction persisted at least for two consecutive sessions without further TsA injection. The effect was of lesser magnitude when the higher cocaine dosage of 0.75 mg/kg/injection was infused (data not shown), suggesting that the HDAC inhibitor actually reduced the reinforcing properties of cocaine. We verified that the injection protocol we used for intravenous TsA delivery in the drug self-administration experiments produced indeed an inhibition of HDAC enzymatic activity in dopaminergic projection fields. For the highest TsA dosage, reduction in cocaine-self administration was statistically significant from the third session, suggesting that 3 daily sessions of TsA injection followed by cocaine infusion remodeled chromatin sufficiently to become behaviorally relevant by modulating the reinforcing properties of cocaine. This is in agreement with our previous data showing that passive administration of cocaine reduced histone H3 acetylation only after repeated injections (Cassel et al., 2006). It was also reported that chronic, but not acute, exposure to cocaine decreases HDAC5 function in the NAc, suggesting that proper balance of histone acetylation is a crucial factor in the salience of a given stimulus (Renthal et al., 2007).

Under the PR schedule of reinforcement, both TsA and depudecin were found to significantly reduce the breaking point, which is defined as the total number of cocaine infusions the rat self-administers within a given session. Although the repeated inhibition of HDACs greatly reduced the motivation of rats for cocaine, this was not the case when rats were allowed to self-administer sucrose. The result shows that TsA treatment did not disturb the operant conditioning and that memory/learning mechanisms underlying the motivated behavior were not affected, as previously suggested by the elevated number of NPs (superior to 80%) directed toward the active hole. Moreover, it is analogous to a recent report showing that repeated high-frequency stimulation of the FCx reduced both cocaine-seeking behavior and the motivation for its consumption but not sucrose reward-related behaviors (Levy et al., 2007). The differential effect between cocaine and the natural reward sucrose suggests that TsA did not diminish cocaine self-administration by a general impairment in the reward system. Although the two compounds probably overlap to a large extent, the neuronal circuitries of natural and drug-related rewards are not identical (Carelli, 2002). Perhaps, the underlying neurocircuitry of natural rewards that

are fundamental for survival is less prone to long-term manipulations and to disruptions mediated by HDAC inhibitors. Incidentally, we found that HDAC activity in nuclear fractions prepared from the FCx was significantly inhibited by cocaine but not by sucrose self-administration. Although it is of course out of question to attribute modifications in a behavior as refined as drug self-administration to changes in a single enzymatic activity (even if this represents the algebraic sum of the activity of 11 distinct enzymes), it is nevertheless tempting to underline the correlation observed between the levels of HDAC enzymatic activities reached in the FCx during treatment with cocaine and sucrose on one side and the differential effect of HDAC inhibitors on the self-administration for the two compounds on the other side.

Our control experiments reveal that the TsA-induced decrease in the motivation for the drug is not attributable to a general malaise, or to a general motivational dysfunction because TsA had no adverse effect on novelty seeking or on cocaine-induced hyperlocomotion. The fact that the inhibition of HDAC activity by TsA had no negative effect on the sucrose preference test strongly suggests that the compound did not produce anhedonia, which would have explained a lack of motivation. In contrast, TsA was found to completely block the cocaine-induced behavioral sensitization. This phenomenon refers to a progressive increased locomotor response of rodents to intermittent administrations of the same dose of an addictive drug (Kalivas and Stewart, 1991). Given its context dependence and persistence, sensitization has been proposed as a central neural mechanism underlying addiction. An incentive-sensitization theory of addiction has been proposed that holds that, just as repeated drug administration sensitizes locomotor responses, it can also sensitize neural circuits that assign incentive salience (but not hedonic value) to drugs and drug-related cues (Robinson and Berridge, 1993). Sensitized incentive salience then produces intense wanting of drugs activated by drug-associated cues. In this line of thinking, our data reporting the blockade of locomotor sensitization by an HDAC inhibitor suggest that the inhibitor may also counteract the neural sensitization leading to drug dependence. This is in agreement with the decrease in the motivation of animals for cocaine we found using the self-administration PR schedule, when considering that (1) the neural sensitization theory implies a dysregulation of motivation; and (2) compulsive drug seeking derives, at least partially, from a drug-induced alteration of the motivation (Wise, 2004; Franken et al., 2005). Neurobiologically, glutamate plays an important role in the induction and expression of behavioral sensitization to stimulants (Vanderschuren and Kalivas, 2000). Based on the current results, decreased behavioral responses to cocaine are likely to result from a decreased glutamatergic neurotransmission controlled by genes, the expression of which derives from an epigenetic regulation of gene transcription.

Our results are in line with a recent report showing that chronic injection into the NAc of another HDAC inhibitor, valproic acid, attenuated amphetamine-induced locomotor activity in rats (Kim et al., 2008). In contrast to this and our present findings, a previous study showed that treatment of rats with the low-affinity HDAC inhibitor butyrate enhanced the locomotor-activating effects of cocaine and that TsA administration to mice potentiated cocaine-induced place conditioning (Kumar et al., 2005). There are several possible explanations for the differences observed. There are methodological issues, such as species (rat versus mouse), circadian cycle (inverted in our study), length of drug administration (cocaine-induced loco-

tor effect was measured over a 2 d period only, whereas we ran the self-administration test over a 2 week period), type of drug administration (passively administered for locomotor activity and conditioned place preference, whereas in our study cocaine was self-administered), as well as type of analysis (locomotor activity and appetitive properties of cocaine, whereas we measured the reinforcing properties of cocaine and the motivation of animals to obtain the drug). Another possibility is that several histone modifications can take place in concert at the same histone tail, corresponding to various states of remodeled chromatin and therefore to the transcription of distinct genes (Cheung et al., 2000; Newton and Duman, 2006). Stability of the epigenetic events is another variable: although studies show that chromatin remodeling requires repeated treatments over several days (Cassel et al., 2006; Tsankova et al., 2006), chromatin can also be rapidly remodeled in response to neuronal stimulation (Chen et al., 2003).

Our data showing that epigenetic regulation of gene transcription taking place in postmitotic neurons is able to influence a motivated behavior put further emphasis on the emerging concept that epigenetic factors play a significant role in the mature working brain. Histone acetylation/deacetylation mechanisms play a key role in this process, and control differentially cocaine-induced reward and reward produced by a natural reinforcer. Some of the genes that are upregulated by the treatment with the HDAC inhibitors are valuable candidates for participating in the plasticity mechanisms occurring in response to drug intake and also for initiating the neurobiological alterations underlying the decrease in the motivation of rats to self-administer cocaine.

References

- Arnold JM, Roberts DC (1997) A critique of fixed and progressive ratio schedules used to examine the neural substrates of drug reinforcement. *Pharmacol Biochem Behav* 57:441–447.
- Bhat RV, Baraban JM (1993) Activation of transcription factor genes in striatum by cocaine: role of both serotonin and dopamine systems. *J Pharmacol Exp Ther* 267:496–505.
- Butler R, Bates GP (2006) Histone deacetylase inhibitors as therapeutics for polyglutamine disorders. *Nat Rev Neurosci* 7:784–796.
- Caine SB, Lintz R, Koob GF (1993) Intravenous drug self-administration techniques in animals. In: *Behavioral neuroscience: a practical approach* (Sahgal A, ed), pp 117–143. Oxford: Oxford UP.
- Carelli RM (2002) Nucleus accumbens cell firing during goal-directed behaviors for cocaine vs. ‘natural’ reinforcement. *Physiol Behav* 76:379–387.
- Cassel S, Carouge D, Gensburger C, Anglard P, Burgun C, Dietrich JB, Aunis D, Zwiller J (2006) Fluoxetine and cocaine induce the epigenetic factors MeCP2 and MBD1 in adult rat brain. *Mol Pharmacol* 70:487–492.
- Chen WG, Chang Q, Lin Y, Meissner A, West AE, Griffith EC, Jaenisch R, Greenberg ME (2003) Derepression of BDNF transcription involves calcium-dependent phosphorylation of MeCP2. *Science* 302:885–889.
- Cheung P, Allis CD, Sassone-Corsi P (2000) Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell* 103:263–271.
- Colvis CM, Pollock JD, Goodman RH, Impey S, Dunn J, Mandel G, Champagne FA, Mayford M, Korzus E, Kumar A, Renthal W, Theobald DE, Nestler EJ (2005) Epigenetic mechanisms and gene networks in the nervous system. *J Neurosci* 25:10379–10389.
- de Ruijter AJ, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg AB (2003) Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* 370:737–749.
- Depoortere RY, Li DH, Lane JD, Emmett-Oglesby MW (1993) Parameters of self-administration of cocaine in rats under a progressive-ratio schedule. *Pharmacol Biochem Behav* 45:539–548.
- Franken IH, Booij J, van den Brink W (2005) The role of dopamine in human addiction: from reward to motivated attention. *Eur J Pharmacol* 526:199–206.
- Hope B, Kosofsky B, Hyman SE, Nestler EJ (1992) Regulation of immediate early gene expression and AP-1 binding in the rat nucleus accumbens by chronic cocaine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5764–5768.
- 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.
- Jenuwein T, Allis CD (2001) Translating the histone code. *Science* 293:1074–1080.
- Jouvert P, Dietrich JB, Aunis D, Zwiller J (2002) Differential rat brain expression of EGR proteins and of the transcriptional corepressor NAB in response to acute or chronic cocaine administration. *Neuromolecular Med* 1:137–151.
- Kalivas PW, Stewart J (1991) Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. *Brain Res Rev* 16:223–244.
- Kim WY, Kim S, Kim JH (2008) Chronic microinjection of valproic acid into the nucleus accumbens attenuates amphetamine-induced locomotor activity. *Neurosci Lett* 432:54–57.
- Kumar A, Choi KH, Renthal W, Tsankova NM, Theobald DE, Truong HT, Russo SJ, Laplant Q, Sasaki TS, Whistler KN, Neve RL, Self DW, Nestler EJ (2005) Chromatin remodeling is a key mechanism underlying cocaine-induced plasticity in striatum. *Neuron* 48:303–314.
- Kwon HJ, Owa T, Hassig CA, Shimada J, Schreiber SL (1998) Depudecin induces morphological reversion of transformed fibroblasts via the inhibition of histone deacetylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3356–3361.
- 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.
- Levy D, Shabat-Simon M, Shalev U, Barnea-Ygaal N, Cooper A, Zangen A (2007) Repeated electrical stimulation of reward-related brain regions affects cocaine but not ‘natural’ reinforcement. *J Neurosci* 27:14179–14189.
- López-Rodas G, Brosch G, Georgieva EI, Sendra R, Franco L, Loidl P (1993) Histone deacetylase. A key enzyme for the binding of regulatory proteins to chromatin. *FEBS Lett* 317:175–180.
- Moratalla R, Robertson HA, Graybiel AM (1992) Dynamic regulation of NGFI-A (*zif268*, *egr1*) gene expression in the striatum. *J Neurosci* 12:2609–2622.
- Nestler EJ (2001) Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat Rev Neurosci* 2:119–128.
- Newton SS, Duman RS (2006) Chromatin remodeling: a novel mechanism of psychotropic drug action. *Mol Pharmacol* 70:440–443.
- Renthal W, Maze I, Krishnan V, Covington HE 3rd, Xiao G, Kumar A, Russo SJ, Graham A, Tsankova N, Kippin TE, Kerstetter KA, Neve RL, Haggarty SJ, McKinsey TA, Bassel-Duby R, Olson EN, Nestler EJ (2007) Histone deacetylase 5 epigenetically controls behavioral adaptations to chronic emotional stimuli. *Neuron* 56:517–529.
- Richardson NR, Roberts DC (1996) Progressive ratio schedules in drug self-administration studies in rats: a method to evaluate reinforcing efficacy. *J Neurosci Methods* 66:1–11.
- Robinson TE, Berridge KC (1993) The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Rev* 18:247–291.
- Sanchis-Segura C, Spanagel R (2006) Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. *Addict Biol* 11:2–38.
- Tsankova NM, Bertone O, Renthal W, Kumar A, Neve RL, Nestler EJ (2006) Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. *Nat Neurosci* 9:519–525.
- Turner BM (2002) Cellular memory and the histone code. *Cell* 111:285–291.
- Vanderschuren LJ, Kalivas PW (2000) Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. *Psychopharmacology (Berl)* 151:99–120.
- Wise RA (2004) Dopamine, learning and motivation. *Nat Rev Neurosci* 5:483–494.
- Yoshida M, Kijima M, Akita M, Beppu T (1990) Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J Biol Chem* 265:17174–17179.

1.1. Résultats complémentaires

L'ensemble des résultats complémentaires à cette étude, correspondant pour certains aux « supplemental data » et pour d'autres aux « data not shown » de l'article, est regroupé dans les figures C1 à C12 reproduites ci-après.

1.1.1. Le FR1

1.1.1.1. Détermination de la cinétique d'inhibition des HDAC

Avant de débiter nos expériences d'AA de cocaïne avec les HDACi, nous avons déterminé la cinétique de l'inactivation de ces enzymes par la TsA. Pour cela nous avons injecté des rats en i.v. avec 0,3 mg/kg de TsA et nous les avons euthanasié 15, 30, 90 ou 150 min plus tard. L'activité HDAC dans des extraits nucléaires de CPF, NAc, et CPu a ensuite été mesurée. La figure C1 montre que l'inhibition des HDAC est effective dans les trois structures dès 15 min après l'injection de TsA. Elle est maximale après 30 min et l'effet de la TsA est réversé après 90 min. C'est au vu de cette cinétique que nous avons injecté la TsA en i.v. 30 min avant chaque session d'AA de cocaïne.

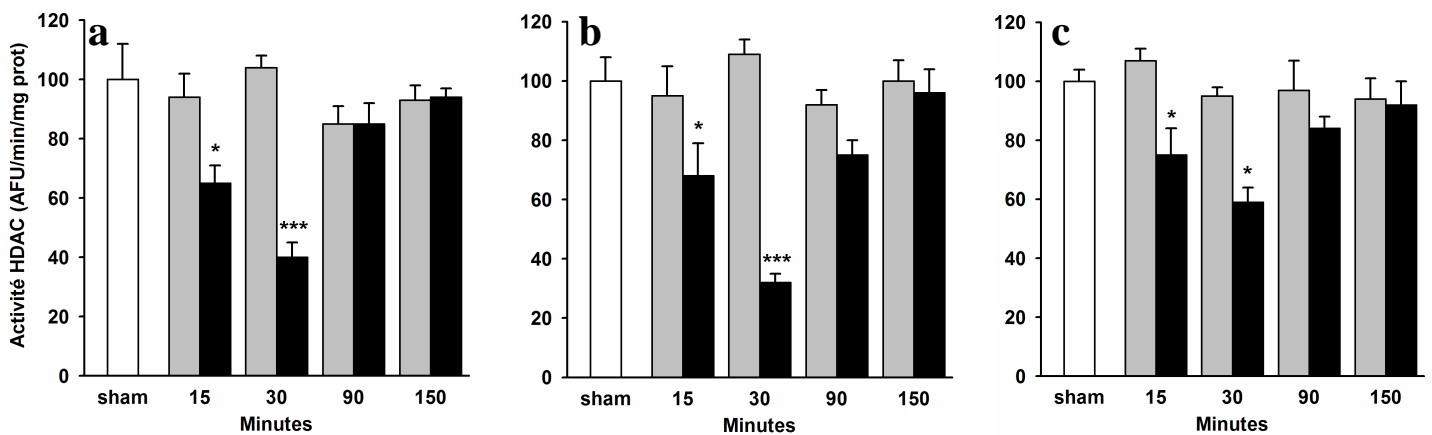


Figure C1. Cinétique d'inhibition de l'activité HDAC par la TsA dans le CPF (a), le NAc (b) et le CPu (c).

Les rats ont été sacrifiés et les structures cérébrales disséquées 15, 30, 90 ou 150 min après une injection i.v. unique de solution véhicule de diméthylsulfoxyde (DMSO 10% ; barres grises) ou de TsA 0,3 mg/kg (barres noires). L'activité HDAC globale a été mesurée dans les fractions nucléaires issues de chaque structure à l'aide d'un test fluorescent Fluor de Lys. Les résultats sont exprimés en pourcentage de ceux obtenus dans un groupe de rats opérés, mais non traités (sham) en tant que moyenne \pm erreur-type ($n = 5$ par groupe). * $p \leq 0,05$ et *** $p \leq 0,001$ en comparaison avec le groupe « sham ». (ANOVA suivie d'un test de comparaison multiple Student-Newman-Keuls). AFU : unité arbitraire de fluorescence.

1.1.1.2. Courbe dose-réponse en FR1

Avant de débiter nos expériences de FR1, nous avons étudié le comportement des rats s'injectant trois doses différentes de cocaïne. La figure C2 illustre le fait que dans nos conditions expérimentales, la courbe dose-réponse en FR1 a bien la forme d'un U inversé vu que les animaux s'injectent en moyenne 30, 90 et 50 fois la cocaïne aux doses unitaires respectives de 0,1 - 0,33 et 0,75 mg/kg/injection.

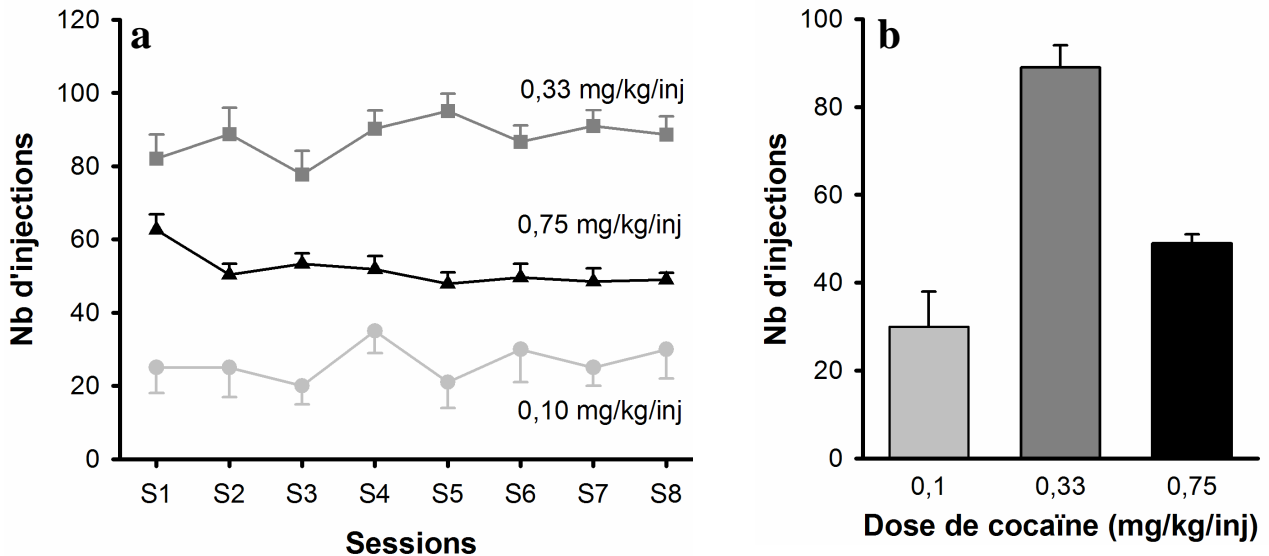


Figure C2. Dose-réponse obtenue en FR1.

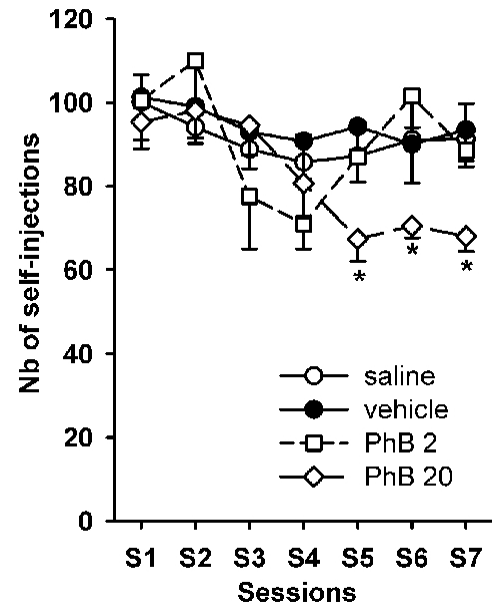
Les graphiques illustrent le nombre d'injections de cocaïne prises par les rats en fonction de la dose de cocaïne dans un protocole de FR1. (a) Comportement des rats au cours des huit sessions journalières d'AA effectuées en FR1 avec trois doses de cocaïne (0,1 - 0,33 ou 0,75 mg/kg/injection). (b) Graphique représentant la relation dose-réponse au 8^{ème} jour d'AA. Dans les deux graphiques, les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm erreur-type (n = 8 à 10 par groupe) du nombre d'injections faites pendant une session de 2 h.

1.1.1.3. Effet du phénylbutyrate sur le FR1

Afin de compléter ces premiers résultats, nous avons testé l'effet d'un autre HDACi, le PhB sur le même protocole de FR1 avec la même dose de drogue. La figure C3, correspondant à la « supplemental data S1 » de l'article, montre que la forte dose de 20 mg/kg de PhB diminue aussi le nombre d'injections effectuées par les animaux. Le PhB appartenant à une autre classe d'HDACi que la TsA, ce résultat appuie l'hypothèse selon laquelle c'est bien l'inhibition des HDAC qui est à l'origine de la diminution des propriétés renforçantes de la drogue.

Figure C3 (« supplemental data S1 » de l'article). Effet du PhB sur l'AA de cocaïne dans le protocole de FR1.

Le PhB (2 ou 20 mg/kg) ou la solution véhicule (DMSO 10%) a été administré i.v. 30 min avant le commencement des sessions d'AA de cocaïne (0,33 mg/kg/injection). Le nombre d'injections effectuées durant les sept sessions journalières de 2 h est exprimé en tant que moyenne \pm erreur-type. Les groupes suivants ont été étudiés : saline (n = 4), véhicule (n = 4), PhB 2 mg/kg (n = 6) et PhB 20 mg/kg (n = 7). * $p \leq 0,05$ en comparaison avec le nombre d'injections effectuées par le groupe « saline » pendant la même session. (ANOVA suivie d'un test de comparaison multiple de Student-Newman-Keuls).



1.1.1.4. Effet de la TsA sur une plus forte dose de cocaïne

Après avoir observé une diminution du nombre d'injection en FR1 pour une dose de cocaïne de 0,33 mg/kg/injection, nous avons recherché l'effet de la TsA sur une dose plus forte de cocaïne. La figure C4 représente le nombre d'injections effectuées par les rats pour une dose de 0,75 mg/kg/injection. Une fois le comportement des rats stabilisé après quatre sessions d'AA, on remarque que pour cette plus forte dose, les rats s'auto-administrent plus de drogue que les animaux contrôles. Nos données montrent que la courbe dose-réponse de la cocaïne en U inversé est décalée vers la droite, ce qui signifie que les HDACi diminuent les propriétés renforçantes de la cocaïne.

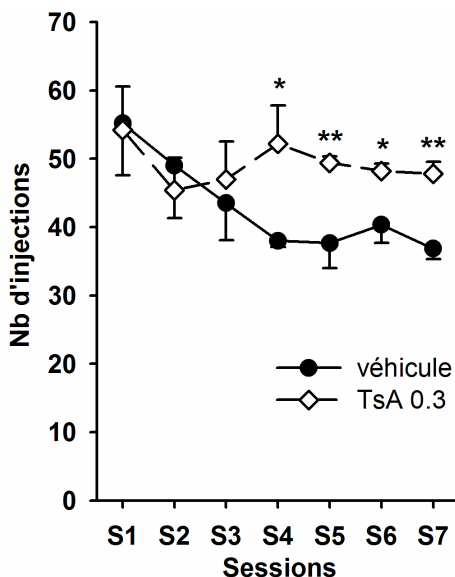


Figure C4. Effet de la TsA sur l'AA de cocaïne (0,75 mg/kg/injection) dans le protocole de FR1.

La TsA (0,3 mg/kg) ou la solution véhicule (DMSO 10%) a été administrée i.v. 30 min avant le commencement des sessions d'AA. Le nombre d'injections effectuées durant les sept sessions journalières de 2 h est exprimé en tant que moyenne \pm erreur-type (n = 5 par groupe). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ et *** $p \leq 0,001$ en comparaison avec le nombre d'injections effectuées par le groupe « véhicule » pendant la même session. (ANOVA suivie d'un test de comparaison multiple de Student-Newman-Keuls).

1.1.1.5. Réversibilité de l'effet de la TsA

Nous avons aussi recherché si l'effet observé avec la TsA était réversible dans le temps. Pour répondre à cette question, des rats ont effectué quatre sessions d'AA avec un traitement par la TsA 0,3 mg/kg, puis le traitement a été stoppé, alors que les rats ont continué à effectuer des sessions de FR1 pendant cinq jours. La figure C5 montre que pendant les trois jours suivant l'arrêt du traitement, les animaux s'injectent toujours moins de cocaïne que les animaux contrôles. Par contre au 4^{ème} jour, cet effet disparaît. Nous pouvons conclure que l'effet des HDACi sur l'AA de cocaïne en FR1 est un effet réversible après quatre jours.

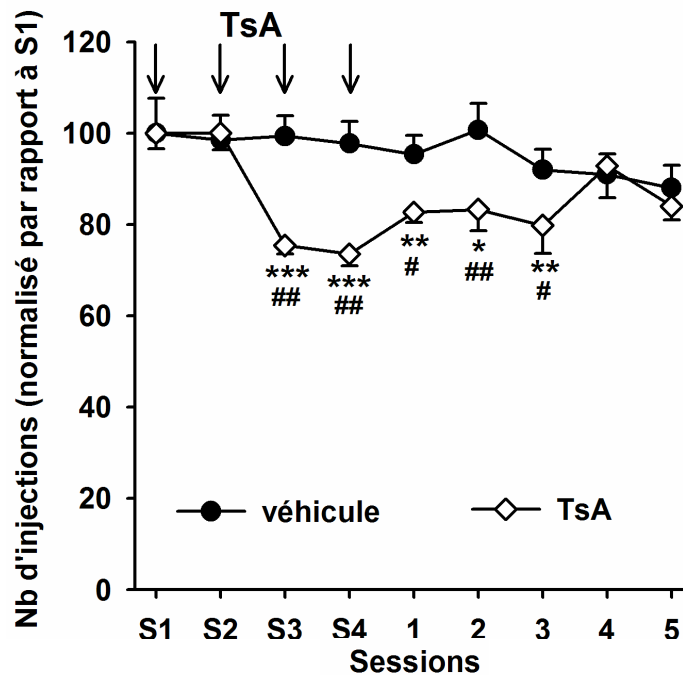


Figure C5. Effet de la TsA sur l'AA de cocaïne dans un protocole de FR1 après l'arrêt du traitement par l'HDACi.

La TsA (0,3 mg/kg) ou la solution véhicule (10% DMSO) a été injectée en i.v. 30 min avant les quatre premières sessions d'AA de cocaïne (S1, S2, S3 et S4 surmontés d'une flèche ; 0,33 mg/kg/injection). Les rats ont alors continué à effectuer des sessions d'AA de cocaïne en l'absence de traitement pharmacologique. Le nombre d'injections effectuées est exprimé en pourcentage du nombre d'injections effectuées durant la session S1 en temps que moyenne \pm erreur-type (n = 4 à 5 par groupe). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ et *** $p \leq 0,001$ en comparaison avec le nombre d'injections effectuées par le même groupe de rat pendant la session S1. # $p \leq 0,05$; ## $p \leq 0,01$ en comparaison avec le nombre d'injections effectuées par le groupe « véhicule » pendant la même session. (ANOVA suivie d'un test de comparaison multiple de Student-Newman-Keuls).

1.1.2. Le PR

1.1.2.1. Courbe dose-réponse en PR

Avant de débiter nos expériences de PR, nous avons également étudié le comportement des rats s'injectant trois doses différentes de cocaïne. La figure C6 illustre le fait que dans nos conditions expérimentales, après stabilisation du comportement, la courbe dose-réponse en PR est rectiligne, dans la mesure des capacités physiques de l'animal. Par exemple pour la dose intermédiaire de 0,33 mg/kg/injection, les animaux s'injectent en moyenne 24 fois, ce qui en terme de NP correspond à 600 NP pour obtenir la dernière injection ou encore plus de 3000 NP sur l'ensemble de la session. Pour la forte dose, les rats effectuent près de 6000 NP durant les 5 h que dure une session de PR.

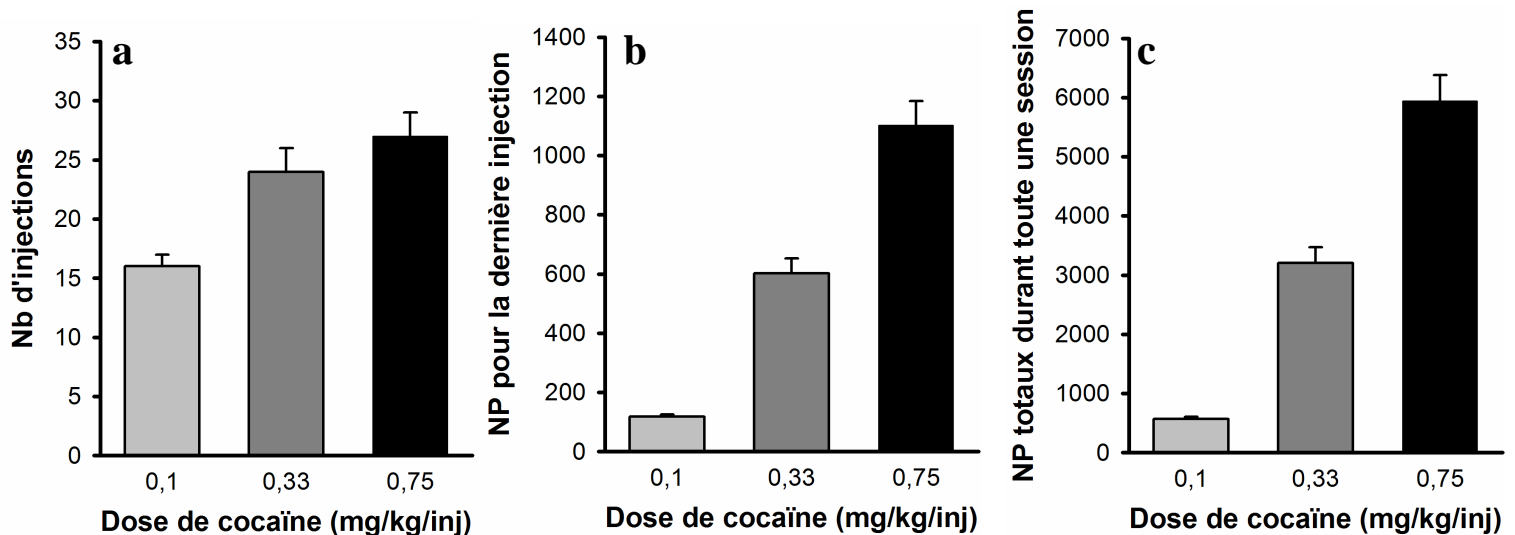


Figure C6. Dose-réponse obtenue en PR.

Les graphiques représentent la relation entre le point de rupture atteint par les rats et la dose de cocaïne injectée dans le protocole de PR. Les graphiques représentent soit le nombre d'injection (a), soit le nombre de NP nécessaires à l'obtention de la dernière injection (b) soit le nombre total de NP effectué par le rat lors d'une session de PR de 5 h (c). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm erreur-type (n = 5 à 7 par groupe).

1.1.2.2. Effet de la dépuDECINE sur le PR

Afin de compléter ces résultats, nous avons testé l'effet d'un autre HDACi, la dépuDECINE sur le même protocole de PR, avec la même dose de drogue. La figure C7, correspondant à la « supplemental data S2 » de l'article, montre que l'injection de 20 nmoles de dépuDECINE directement dans les ventricules cérébraux diminue également le nombre d'injections effectuées par les animaux. La dépuDECINE appartenant à une autre classe d'HDACi que la TsA, ce résultat appuie l'hypothèse selon laquelle c'est bien l'inhibition des HDAC qui est à l'origine de la diminution de la motivation des animaux pour la drogue.

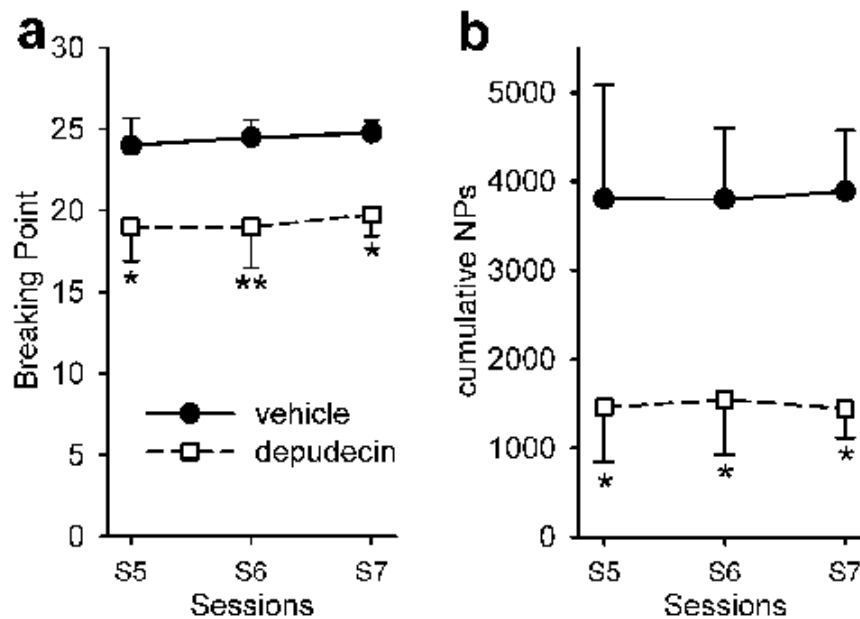


Figure C7 (« supplemental data S2 » de l'article). Effet de la dépuDECINE sur l'AA de cocaïne (0,33 mg/kg/injection) dans le protocole de PR. La dépuDECINE (20 nmoles) ou la solution véhicule (DMSO 10%) a été administrée i.c.v. 30 min avant le commencement des sessions d'AA. Les graphiques représentent soit le nombre d'injection (a), soit le nombre total de NP effectué par le rat lors d'une session de PR de 5 h (b) durant les trois dernières sessions de PR. Les groupes suivants ont été étudiés : « véhicule » (n = 10), 20 nmoles de dépuDECINE i.c.v. (n = 7). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ en comparaison entre les valeurs des deux groupes pendant la même session. (ANOVA suivie d'un test de comparaison multiple de Student-Newman-Keuls).

1.1.2.3. Effet de la TsA lorsqu'elle est injectée uniquement en PR

En utilisant le protocole de PR, une diminution de la motivation des rats pour la cocaïne a été obtenue chez des animaux ayant été traités auparavant pendant sept sessions de FR1. Vu que ce traitement par la TsA, pendant les sessions de FR1, diminue la prise de cocaïne par l'animal, il fallait s'assurer que cet effet n'était pas à l'origine des différences observées en PR. Pour répondre à cette question, des rats ont été soumis à sept sessions de FR1, sans traitement par la TsA puis à sept sessions de PR après avoir été injectés en i.v. par la TsA (0,3 mg/kg). La figure C8 montre que si les injections de TsA ne sont faites qu'à partir de la première session de PR, on ne note pas de différence entre les deux groupes expérimentaux lors des sessions 1 et 2. Une différence significative apparaît à partir de la 3^{ème} session de PR et cette différence croît au fur et à mesure des sessions. Ce résultat montre que ce n'est pas le traitement pendant les sessions de FR1 qui explique la diminution de la motivation des rats à s'auto-administrer la cocaïne en PR.

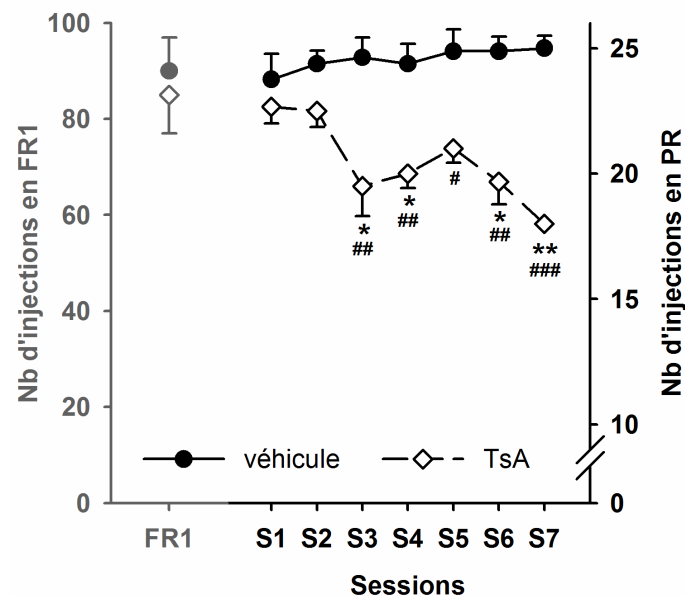


Figure C8. Effet de la TsA sur le protocole de PR chez des rats n'ayant pas été traités préalablement par la TsA lors des sessions de FR1.

Les rats ont effectué sept sessions de FR1 sans aucun traitement (La valeur présentée correspond au nombre d'injections faites lors de la 7^{ème} session de FR1). Puis, la TsA (0,3 mg/kg) ou la solution véhicule (10% DMSO) ont été injectées en i.v. 30 min avant les sept sessions de PR. Le nombre d'injections effectuées est exprimé en tant que moyenne \pm erreur-type ($n = 5$ par groupe). * $p \leq 0,05$ et ** $p \leq 0,01$ en comparaison avec le nombre d'injections effectuées par le même groupe de rat lors de la session S1. # $p \leq 0,05$; ## $p \leq 0,01$ et ### $p \leq 0,001$ en comparaison avec le nombre d'injections effectuées par le groupe «véhicule» pendant la même session. (ANOVA suivie d'un test de comparaison multiple de Student-Newman-Keuls).

1.1.3. Expériences contrôles et mesures d'activités HDAC

1.1.3.1. Effet des HDACi sur la prise de poids des animaux

Nous avons, en parallèle de nos analyses comportementales, suivi l'évolution du poids des rats dans les différents groupes expérimentaux dans le but de détecter si les HDACi pouvaient altérer l'état général de nos animaux. Le graphique de la figure C9 montre que, quel que soit le traitement effectué, les rats s'auto-administrant de la cocaïne prennent régulièrement du poids et que les différents HDACi, injectés i.v. ou i.c.v., n'interfèrent en rien dans ce processus.

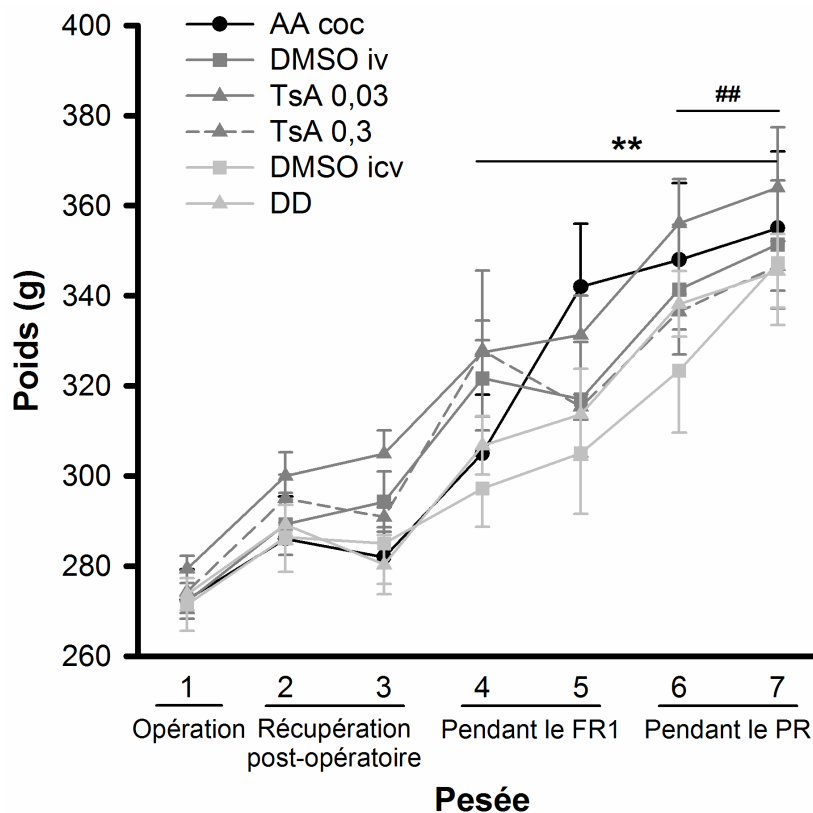


Figure C9. Effet des HDACi sur le poids des rats.

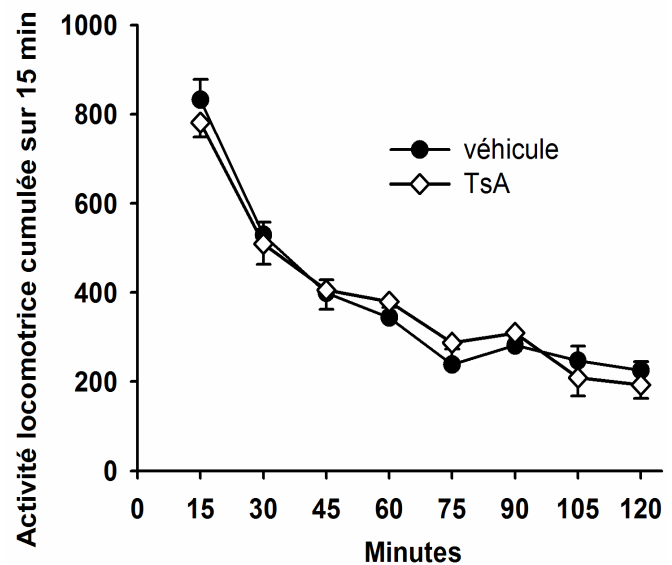
Le graphique représente l'évolution du poids des rats du jour de l'opération chirurgicale (1 « opération ») jusqu'au dernier jour d'AA de cocaïne dans le protocole de PR (7 « pendant le PR »). Six groupes sont représentés : AA de cocaïne seule (AA coc ; n = 10), AA avec traitement par le DMSO 10% i.v. (DMSO iv ; n = 12), AA avec traitement par la TsA 0,03 mg/kg i.v. (TsA 0,03 ; n = 13), AA avec traitement par la TsA 0,3 mg/kg i.v. (TsA 0,3 ; n = 12), AA avec traitement par le DMSO 10% i.c.v. (DMSO i.c.v. ; n = 10), AA avec traitement par la dépodécine (20 nmole i.c.v. ; DD ; n = 7). Chaque point représente la moyenne \pm erreur-type. ** $p \leq 0,01$ en comparaison avec le jour de l'opération, ## $p \leq 0,01$ en comparaison avec le dernier jour de FR1 (ANOVA à deux facteurs de variation (traitement et jour de pesée) suivie d'un test de comparaison multiple de Student-Newman-Keuls).

1.1.3.2. Effet de la TsA sur l'activité exploratoire

Avant de mesurer les effets de la TsA sur l'hyperlocomotion induite par la cocaïne et sur la sensibilisation comportementale, nous avons testé l'effet de cet HDACi sur l'activité exploratoire des rats dans un environnement nouveau. Ceci dans le but de vérifier que la diminution de la motivation en PR n'était pas due, au moins partiellement, à un effet de la TsA sur l'activité locomotrice. Le graphique C10 montre que la TsA ne perturbe pas l'activité exploratoire.

Figure C10. Effet de la TsA sur l'activité exploratoire dans un environnement nouveau.

Pendant trois jours, les rats ont été traités par une injection de TsA (0,3 mg/kg) ou de solution véhicule (10% DMSO) puis ils ont été placés dans leur cage habituelle. Le 4^{ème} jour, 30 min après la 4^{ème} injection, les rats ont été placés dans l'environnement nouveau que représente pour eux la cage de mesure de l'activité locomotrice. L'activité déambulatoire a été mesurée sur des périodes de 15 min. Chaque point représente la moyenne \pm erreur-type (n = 6 par groupe) du nombre de passages d'une zone délimitée par des faisceaux infrarouges à une autre. (ANOVA à deux facteurs de variation-traitement et minutes).



1.1.3.3. Effet de l'AA de cocaïne et de saccharose sur l'activité HDAC

Enfin, les figures C11 et C12 montrent des résultats complémentaires à ceux exposés respectivement dans les figures 3 et 6 de l'article. Tout comme dans le cortex frontal et le NAc, l'inhibition de l'activité HDAC par la TsA est effective dans le CPu, l'amygdale, l'hippocampe et le cervelet, 30 min après la 4^{ème} injection de TsA et ceci aussi bien chez des rats non traités que chez des rats injectés i.p. par 30 mg/kg de cocaïne ou encore chez des rats s'auto-administrant de la cocaïne en FR1 (Fig. C11). Le fait que l'on observe, après dix jours d'AA de cocaïne ou de saccharose en FR1, des effets différents sur l'activité HDAC dans le CPu, l'hippocampe et l'amygdale (Fig. C12) pourrait expliquer pourquoi la TsA altère l'AA de cocaïne sans affecter celle de sucrose.

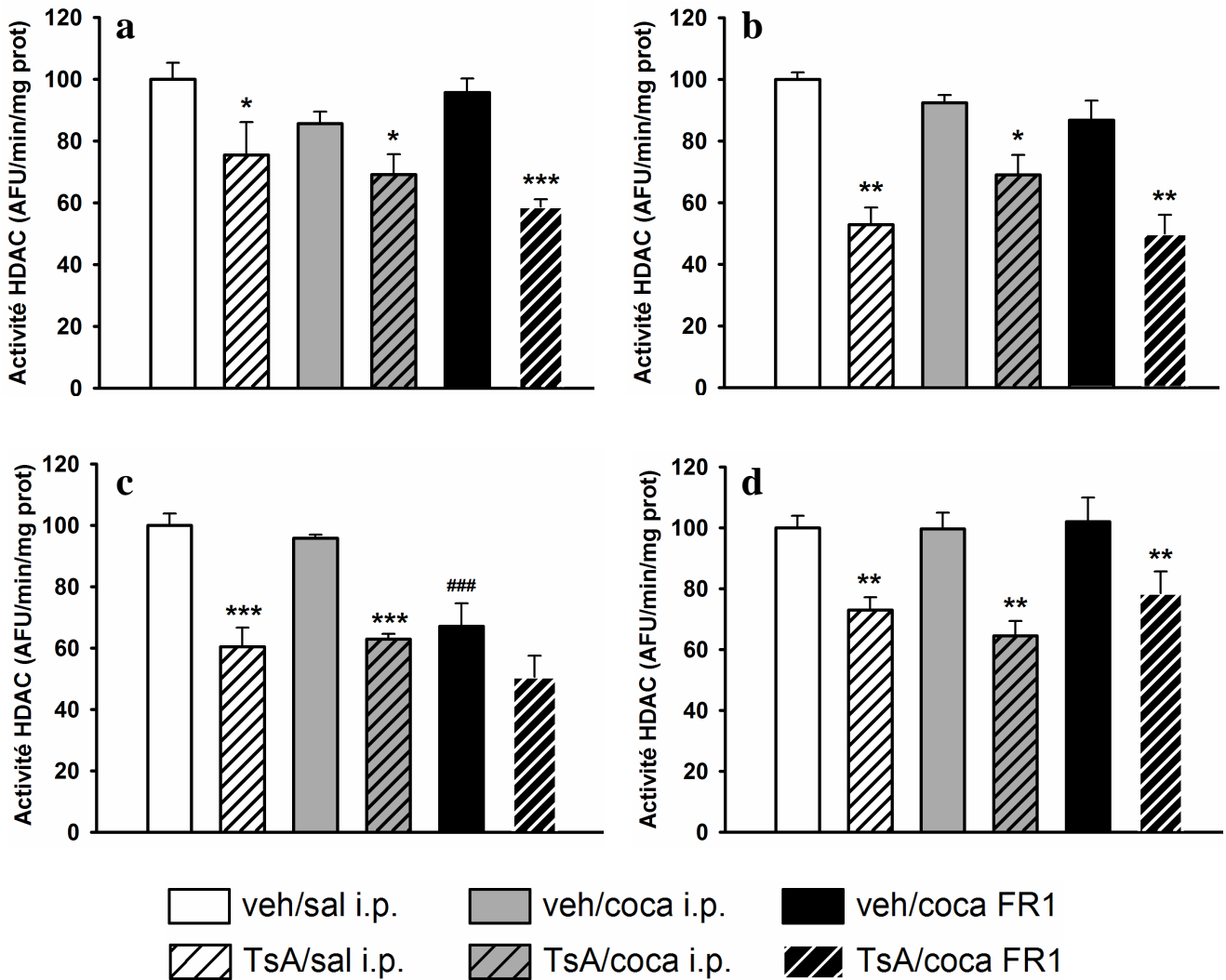


Figure C11. Effet de la TsA sur l'activité HDAC nucléaire dans le CPU (a), l'amygdale (b), l'hippocampe (c) et le cervelet (d).

La TsA (0,3 mg/kg) ou la solution véhicule (veh; 10% DMSO) a été injectée en i.v. pendant quatre jours. Des injections i.p. (0,9% NaCl (sal) ou 30 mg/kg cocaïne (coca)) ou 2 h d'AA de cocaïne dans un protocole de FR1 (0,33 mg/kg/injection) ont été réalisées tous les jours pendant trois jours consécutifs, 30 min après les injections de TsA ou de solution véhicule. Les rats ont été euthanasiés et les structures cérébrales disséquées 30 min après la 4^{ème} injection de TsA ou de solution véhicule (ce qui correspond à 24 h après la dernière injection de cocaïne). L'activité HDAC globale a été mesurée dans les fractions nucléaires issues de chaque structure à l'aide d'un test fluorescent Fluor de Lys. Les résultats sont exprimés en pourcentage du groupe contrôle (veh/sal i.p.) comme moyenne \pm erreur-type (n = 6 à 9 par groupe). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ et *** $p \leq 0,001$ en comparaison avec le groupe traité par la solution véhicule correspondante, ### $p \leq 0,001$ en comparaison avec le groupe traité par la solution de 0,9% NaCl (veh/sal i.p.) (ANOVA suivie d'un test de comparaison multiple de Student-Newman-Keuls). AFU : unité arbitraire de fluorescence.

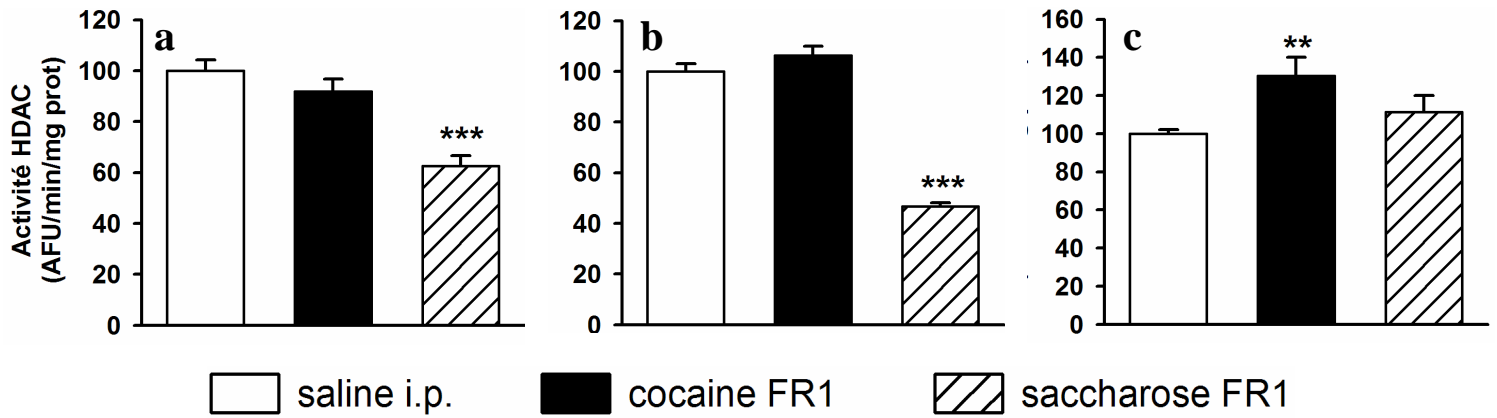


Figure C12. Effet de l'AA de cocaïne ou de saccharose sur l'activité HDAC nucléaire dans le CPu (a), l'amygdale (b) et l'hippocampe (c).

Les rats ont reçu 10 injections i.p. de NaCl 0,9% (saline) ou ont effectué dix jours d'AA de cocaïne (0,33 mg/kg/injection) ou de sucrose (obtention de 300 µl de sucrose 10%) dans un protocole de FR1. Deux h après la fin de la 10^{ème} session ou injection, les rats ont été euthanasiés et les structures cérébrales disséquées. L'activité HDAC globale a été mesurée dans les fractions nucléaires issues de chaque structure à l'aide d'un test fluorescent. Les résultats sont exprimés en pourcentage du groupe contrôle (saline i.p.) en tant que moyenne ± erreur-type (n = 7 par groupe). ** $p \leq 0,01$ et *** $p \leq 0,001$ en comparaison avec le groupe « saline i.p. ». (ANOVA suivie d'un test de comparaison multiple de Student-Newman-Keuls). AFU : unité arbitraire de fluorescence.

2. Publication n°2

The Inhibition of Histone Deacetylases Reduces the Reinstatement of Cocaine-Seeking Behavior in Rats

Pascal Romieu, Elodie Deschatrettes, Lionel Host, Serge Gobaille, Guy Sandner, Jean Zwiller
Current Neuropharmacology, 2010 (sous presse)

Nos résultats montrent que des HDACi diminuent la motivation des rats pour la cocaïne. Chez l'homme, d'un point de vue clinique, la dépendance se caractérise principalement par un risque permanent de rechute même après de très longues périodes de sevrage. Ce fait constitue d'ailleurs l'obstacle majeur au succès de tous les traitements. Chez l'homme, le principal facteur de rechute est l'exposition à des stimuli précédemment associés à la consommation de drogue. Une des hypothèses avancées suppose que la rechute résulte des neuroadaptations mises en place lors de la prise répétée de drogue. Cette plasticité cérébrale nécessite l'expression de nombreux gènes, dont certains sont connus pour être sous le contrôle de régulations épigénétiques.

Nous avons démontré dans cette étude que la TsA (0,3 mg/kg) et le PhB (20 ou 100 mg/kg) diminuent significativement le comportement de recherche de cocaïne dans un protocole de rechute. Dans ces expériences, les rats ont effectué dix sessions d'AA en FR1 puis ont été sevrés pendant trois semaines. La rechute a été induite par la combinaison d'une injection de cocaïne et d'une réexposition des animaux à un stimulus préalablement associé à la prise de cocaïne, à savoir une lumière au-dessus de l'orifice actif. Concernant le traitement pharmacologique, les différents HDACi ont été injectés i.v. pendant cinq jours consécutifs, à savoir les quatre derniers jours de sevrage et le jour du test, 30 min avant la rechute. Nos résultats suggèrent qu'un traitement pharmacologique modulant les régulations épigénétiques, et plus particulièrement l'inhibition des HDAC, pourrait réduire le risque de rechute après une période de sevrage.

Abstract:

Drug addiction is a chronic brain disease characterized by a persistent risk of relapse, even after a long period of abstinence. A current hypothesis states that relapse results from lasting neuroadaptations that are induced in response to repeated drug administration. The adaptations require gene expression, some of which being under the control of stable epigenetic regulations. We have previously demonstrated that pretreatment with histone deacetylase (HDAC) inhibitors reduces the cocaine reinforcing properties as well as the motivation of rats for cocaine. We show here that the same HDAC inhibitors, trichostatin A and phenylbutyrate, significantly reduced the cocaine-seeking behavior induced by the combination of a cocaine injection together with the exposure to a light cue previously associated with cocaine taking. Reinstatement of drug-seeking behavior was carried out after a 3-week withdrawal period, which came after ten daily sessions of cocaine intravenous self-administration. Our results suggest that pharmacological treatment aimed at modulating epigenetic regulation, and particularly treatment that would inhibit HDAC activity, could reduce the risk of relapse, a major drawback in the treatment of drug addiction.

Key Words: Drug dependence, cocaine self-administration, cocaine-seeking behavior, epigenetic regulation, histone deacetylase, trichostatin A, phenylbutyrate.

INTRODUCTION

Drug dependence is currently viewed as a chronic brain disease characterized primarily by a compulsive drug-seeking and drug-taking behavior. The development of dependence to drugs of abuse occurs over time and requires cellular adaptations. Characterization of long-term plasticity underlying addiction is currently an intensive research area and concerns mainly the characterization of changes in gene expression evoked by drugs of abuse [13]. Several studies have highlighted the importance of epigenetic regulations of gene transcription in diverse aspects of psychiatric disorders, including addiction [2, 15, 16]. Epigenetic regulations are complex mechanisms that control neuronal gene transcription by regulating the accessibility of genes to the transcriptional machinery [3]. Access to DNA in the nucleosome is achieved via complex associations of proteins in which posttranslational modifications of histones play a major role. In general, increased histone acetylation is associated with DNA relaxation and elevated transcriptional activity, whereas decreased acetylation brought about by histone deacetylases (HDACs) results in tighter DNA coiling and gene silencing [7, 10, 19].

We have shown that repeated injections of cocaine regulate chromatin remodeling by inducing the methyl-CpG-binding proteins MeCP2 and MBD1 in rat brain [2, 15, 16]. The manipulation of chromatin remodeling enzymes by pharmacological inhibition revealed that cocaine-induced changes in chromatin structure are behaviorally relevant. We showed for instance that treatment with the HDAC inhibitors trichostatin A (TsA) or phenylbutyrate (PhB) reduces the cocaine reinforcing properties under a fixed-ratio 1 (FR1) schedule of cocaine intravenous (i.v.) self-administration protocol [17]. Experiments using the progressive-ratio schedule of reinforcement showed that HDAC inhibition also attenuated the motivation of rats for cocaine, but not for the natural reinforcer sucrose.

A unique characteristic of addiction, from a clinical point of view, is the persistence of relapse risk long after a person has stopped taking drugs, which constitutes a major obstacle to successful treatment [12]. Much drug taking, including late relapses, follows exposure to cues previously associated with drug use [14, 18]. The cues include external sensory stimuli such as drug paraphernalia as well as interoceptive stimuli [6]. In animal models, reinstatement of drug self-administration is strongly motivated by re-exposure to even small doses of the drug, and therefore to positive reminders of drug use. Given that HDAC inhibitors were able to reduce the cocaine reinforcing properties in rats under an i.v. self-administration protocol, we investigated in the present study whether the HDAC inhibitors would also modulate the

cocaine-seeking behavior reinstated by the combination of cocaine-priming and cocaine-related cues after a withdrawal period.

MATERIALS & METHODS

Animals and treatment

Male Wistar rats (Janvier, France), weighing 150–175 g, were housed in standard home cages under an inverted 12 h light/dark cycle (lights on at 7:00 PM). Animals had access to food and water *ad libitum*. After surgery for i.v. catheter implantation, they were housed in individual cages. They were allowed to recover for 5–7 days before the beginning of the self-administration sessions which were conducted during the dark period. All procedures involving animal care were conducted in compliance with current laws and policies (Council directive 87848, *Service Vétérinaire de la Santé et de la Protection Animales*; permission 67-165 to JZ). Cocaine hydrochloride (Cooper, France) solution was adjusted with 0.9% NaCl to infuse an i.v. dose of 0.33 mg/kg/injection during self-administration session. TsA (Sigma-Aldrich), sodium 4-phenylbutyrate (Fluka, Sigma-Aldrich) or 10% DMSO in saline were administered i.v. Catheterization procedure into the jugular vein was performed as previously described [17].

Cocaine operant self-administration and reinstatement procedure

Studies were conducted in dark operant chambers (30 × 30 × 30 cm) located in a sound-attenuated room [17]. Each chamber was equipped with two 3 cm-diameter holes on the same wall, located 4 cm above the floor; one was selected as the active hole for delivering the reinforcer and the other as the inactive hole. They were counterbalanced between right and left position in the various groups of rats. Nose-pokes (NPs) into the inactive hole had no programmed consequence. When the number of required NPs into the active hole was reached, a 40 µl cocaine solution was delivered during a 3-sec period. A stimulus green light (3Hz flash), located 8 cm above the active hole, was paired contingently with the delivery of cocaine (3 sec). Immediately after each cocaine infusion, a white house light was switched on and persisted during a 40-sec time-out period.

For cocaine self-administration procedure [9], rats were submitted to an FR1 schedule of reinforcement during daily 1 h sessions for 10 days. In this schedule, each NP into the active hole during the valid period triggered an i.v. infusion of cocaine solution. No cutoff was applied concerning the number of self-infusions the rat was able to perform during the session. After the 10-day period of self-administration, rats were submitted to a withdrawal

period of 3 weeks, during which they were housed individually in their home cages. Starting 4 days before the reinstatement session, they were i.v. injected daily with the HDAC inhibitors or with vehicle (10% DMSO in saline), the fifth and last injection occurring the day of the reinstatement, 30 min before the session. The reinstatement session started immediately after rats were given i.p. injections of 15 mg/kg cocaine. NPs performed in each hole were then recorded for 1 h. NPs in the active hole successively turned on the green light for 3 sec and the house light for 40 sec, but no cocaine solution was delivered during the reinstatement session.

RESULTS

When rats were trained to i.v. self-administer cocaine (0.33 mg/kg/injection) during daily 1-h sessions under a FR1 schedule of reinforcement, a stable behavior could be observed after 3 sessions (data not shown), that remained until the tenth session. At the end of the self-administration period, four balanced groups of rats were established from the results obtained during the 3 last sessions, so that they displayed a similar pattern of behavior in terms of number of injections, as shown in Fig. (1A) as well as of NP activity in the active and inactive holes, as depicted in Fig. (1B). The percentage of NPs performed in the active hole by all groups was higher than 80% during the three last sessions (data not shown). Rats were then submitted to a 3-week period of withdrawal.

Animals were treated daily with the HDAC inhibitors or vehicle for five consecutive days, the last injection occurring 30 min before the reinstatement session. Fig. (2) shows that during the 1-h session, i.v. injection of 0.3 mg/kg TsA significantly reduced the cocaine- and cue-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior. When compared to control vehicle-treated animals, rats treated with TsA reduced the number of NPs directed towards the active hole by a mere 57%. Similarly, treatment with the HDAC inhibitor PhB produced a marked dose-dependent reduction in cocaine-seeking behavior in rats, since the number of NPs achieved into the active hole was reduced by 36% and 59%, when animals were treated i.v. with 20 and 100 mg/kg PhB, respectively. It is noteworthy that the NPs achieved into the inactive hole, representing about 18% of those realized into the active hole for the control group of rats, were similar in all the groups considered (Fig. 2).

Fig. (3) illustrates the cocaine-seeking behavior of the same groups of rats, but considering shorter time-intervals than the whole 1 h reinstatement session. It is shown that control rats realized most of their NPs during the first 30-min period, with a maximum

occurring during the 20 to 30 min interval, and then the number of NPs progressively decreased towards the end of the session. No statistical difference could be established between the different intervals, though. In contrast, animals treated with TsA completed less NPs during the first 10-min interval, and the number of NPs remained quite stable during the entire session, achieving statistically significant differences when compared to control rats. The low dose of PhB produced a somehow linear decline in the number of NPs rats were achieving during the reinstatement session, with statistically significant differences being noticed for the second and third interval. The higher PhB dosage produced a profile similar to that observed in TsA-treated animals, with statistically significant differences, compared to control rats, being found for three out of the six 10-min time intervals considered.

DISCUSSION

Since we have previously reported that pretreatment with HDAC inhibitors reduces the cocaine reinforcing properties as well as the motivation of rats for cocaine [17], we investigated in the present study whether these pharmacological agents were also able to affect the cocaine-seeking behavior. To this end, we trained rats under an FR1 schedule of i.v. cocaine self-administration protocol for ten days, which was followed by a 3-week withdrawal period. The reinstatement session was carried out after a treatment for 5 days with the HDAC inhibitors. A 5-day treatment was selected because we noticed previously that TsA, at the dosage of 0.3 mg/kg, produced a statistically significant effect on cocaine self-injections from the third session [17]. We show here that both TsA and PhB significantly reduced the cocaine-seeking behavior induced by the combination of a cocaine injection together with the exposure to a light cue previously associated with cocaine taking. While this does not allow to identify which one of the two parameters is primarily affected by the HDAC inhibitors, we consider that the combination of both stimuli is more appropriate to model the situation that addicted individuals are facing. While TsA had a strong effect at the dose of 0.3 mg/kg, it took up to 100 mg/kg of PhB to reduce significantly the cocaine-seeking behavior. This is actually in agreement with their respective inhibition potency: TsA, a member of the hydroxamate group of HDAC inhibitors, displays an *in vitro* IC₅₀ in the nanomolar range [20], whereas PhB, from the class of aliphatic acids, has an affinity in the micromolar range [1]. The two inhibitors show no selectivity for particular members of class I, II or IV HDACs [1].

The data show that five daily sessions of TsA or PhB injection remodeled chromatin sufficiently to become behaviorally relevant, by preventing the reinstatement of drug-induced

behavioral changes. This is in agreement with our previous data showing that the HDAC inhibitors reduced the reinforcing properties of cocaine [17]. The results are also in line with a recent report showing that administration of an HDAC inhibitor facilitates the extinction of cocaine-induced conditioned place preference and reduces the reactivation of place preference [11]. The similar results obtained when using the two paradigms (drug self-administration and conditioned place preference) clearly indicate that neuroadaptations taking place in response to repeated cocaine injections and underlying drug craving [5] are under the control of epigenetic regulations of gene expression, which involve modification of histone acetylation. It is noteworthy that intrahippocampal delivery of HDAC inhibitors has been shown to facilitate fear extinction in a contextual fear conditioning paradigm [8]. On the opposite, TsA administration to mice after a spatial learning task phase was found to improve the memory performances during the retention phase [4]. Together, the data suggest that other cognitive processes than only memory/learning mechanisms underlie drug extinction and drug seeking behavior, in line with the fact that drug addiction concerns other brain structures, such as the nucleus accumbens or the dorsal striatum, than those involved in spatial memory.

Since chromatin remodeling was sufficient to alter a behavior as elaborate as drug-seeking, an animal model of drug relapse, the findings provide a potential novel target for the development of treatments that would facilitate reduction in drug dependence. It should be noted that HDAC inhibitors were efficient in reducing cocaine-seeking behavior despite the severe conditions the test was carried out. In effect, one has to consider that i) we used a combination of cocaine injection and exposure to a light cue to induce cocaine reinstatement; ii) rats were not submitted to an extinction protocol after the self-administration training procedure, but to a withdrawal period. In the latter condition, being back to the context of the test chamber was probably accountable for some NP activity (in addition to drug priming) developed by the rats during the reactivation session.

In conclusion, our results strongly suggest that treatment aimed at modulating epigenetic regulations, especially the pharmacological inhibition of HDAC activity, could reduce the risk of relapse, a major drawback in the treatment of drug addiction.

REFERENCES

- [1] Butler, R., Bates, G.P. (2006) Histone deacetylase inhibitors as therapeutics for polyglutamine disorders. *Nat Rev Neurosci*, **7**, 784-796.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] Fischer, A., Sananbenesi, F., Wang, X., Dobbin, M., Tsai, L.H. (2007) Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling. *Nature*, **447**, 178-182.
- [5] Grimm, J.W., Hope, B.T., Wise, R.A., Shaham, Y. (2001) Neuroadaptation. Incubation of cocaine craving after withdrawal. *Nature*, **412**, 141-142.
- [6] Hyman, S.E., Malenka, R.C., Nestler, E.J. (2006) Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annu Rev Neurosci*, **29**, 565-598.
- [7] Jenuwein, T., Allis, C.D. (2001) Translating the histone code. *Science*, **293**, 1074-1080.
- [8] Lattal, K.M., Barrett, R.M., Wood, M.A. (2007) Systemic or intrahippocampal delivery of histone deacetylase inhibitors facilitates fear extinction. *Behav Neurosci*, **121**, 1125-1131.
- [9] LeSage, M.G., Stafford, D., Glowa, J.R. (1999) Preclinical research on cocaine self-administration: environmental determinants and their interaction with pharmacological treatment. *Neurosci Biobehav Rev*, **23**, 717-741.
- [10] Lopez-Rodas, G., Brosch, G., Georgieva, E.I., Sendra, R., Franco, L., Loidl, P. (1993) Histone deacetylase. A key enzyme for the binding of regulatory proteins to chromatin. *FEBS Lett*, **317**, 175-180.
- [11] Malvaez, M., Sanchis-Segura, C., Vo, D., Lattal, K.M., Wood, M.A. (2009) Modulation of Chromatin Modification Facilitates Extinction of Cocaine-Induced Conditioned Place Preference. *Biol Psychiatry*, in the press.
- [12] McLellan, A.T., Lewis, D.C., O'Brien, C.P., Kleber, H.D. (2000) Drug dependence, a chronic medical illness: implications for treatment, insurance, and outcomes evaluation. *Jama*, **284**, 1689-1695

- [13] Nestler, E.J. (2001) Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat Rev Neurosci*, **2**, 119-128.
- [14] 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.
- [15] Pandey, S.C., Ugale, R., Zhang, H., Tang, L., Prakash, A. (2008) Brain chromatin remodeling: a novel mechanism of alcoholism. *J Neurosci*, **28**, 3729-3737.
- [16] Renthal, W., Nestler, E.J. (2008) Epigenetic mechanisms in drug addiction. *Trends Mol Med*, **14**, 341-350.
- [17] 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.
- [18] Tiffany, S.T. (1990) A cognitive model of drug urges and drug-use behavior: role of automatic and nonautomatic processes. *Psychol Rev*, **97**, 147-168.
- [19] Turner, B.M. (2002) Cellular memory and the histone code. *Cell*, **111**, 285-291.
- [20] Yoshida, M., Kijima, M., Akita, M., Beppu, T. (1990) Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J Biol Chem*, **265**, 17174-17179.

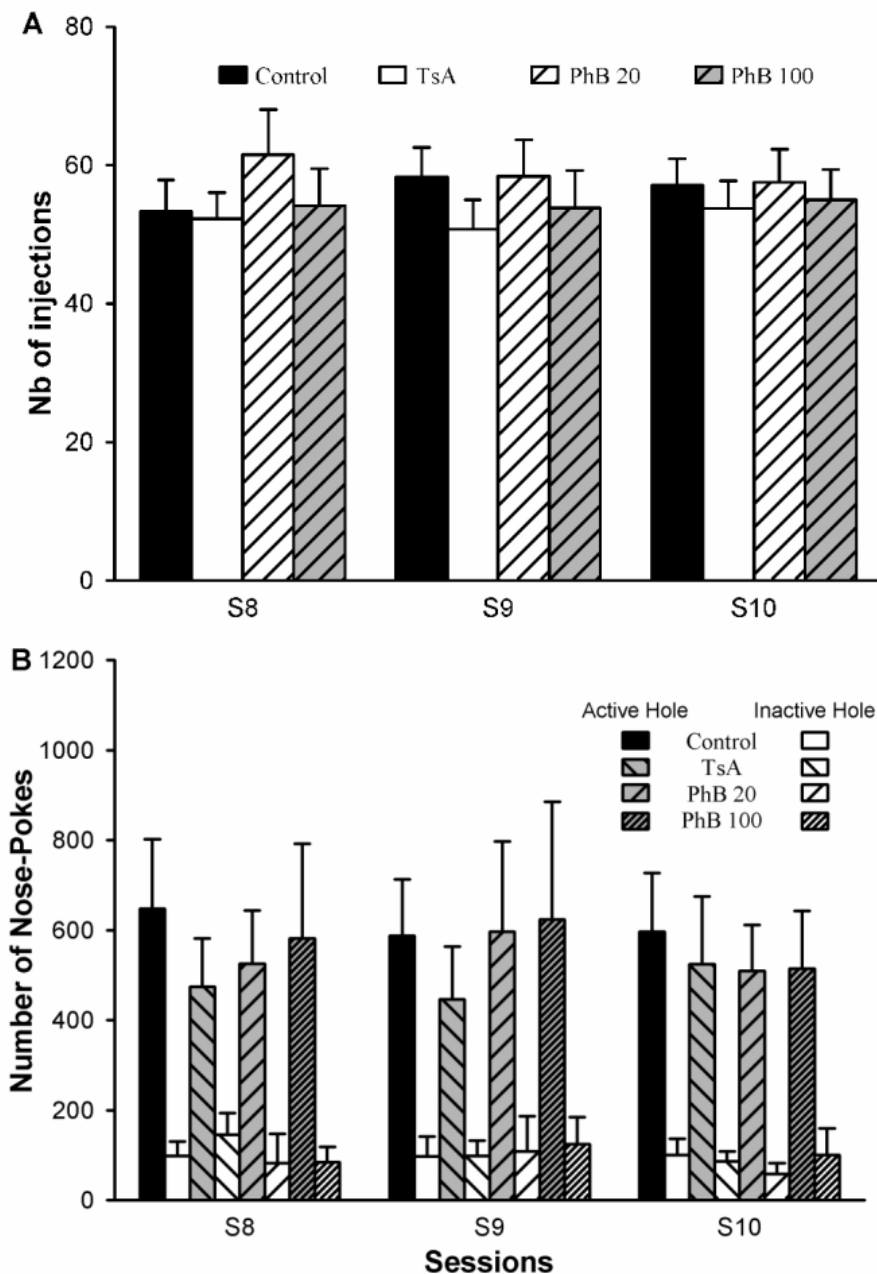


Fig. (1). I.v. cocaine self-administration by rats during the 3 last FR1 sessions.

Rats were trained to self-administer cocaine (0.33 mg/kg/injection) during daily 1-h sessions under a FR1 schedule of reinforcement for 10 days. Results for the 3 last sessions are presented as (A), the number of self-injections performed during each session; (B), the number of NPs achieved in the active and inactive holes. Results are expressed as means \pm sem. Rats were dispatched into several groups, as indicated, in view of the pharmacological treatment beginning 4 days before the reinstatement session. Control vehicle-treated group, $n=11$; 0.3 mg/kg TsA, $n=12$; 20 mg/kg PhB, $n=7$; 100 mg/kg PhB, $n=8$.

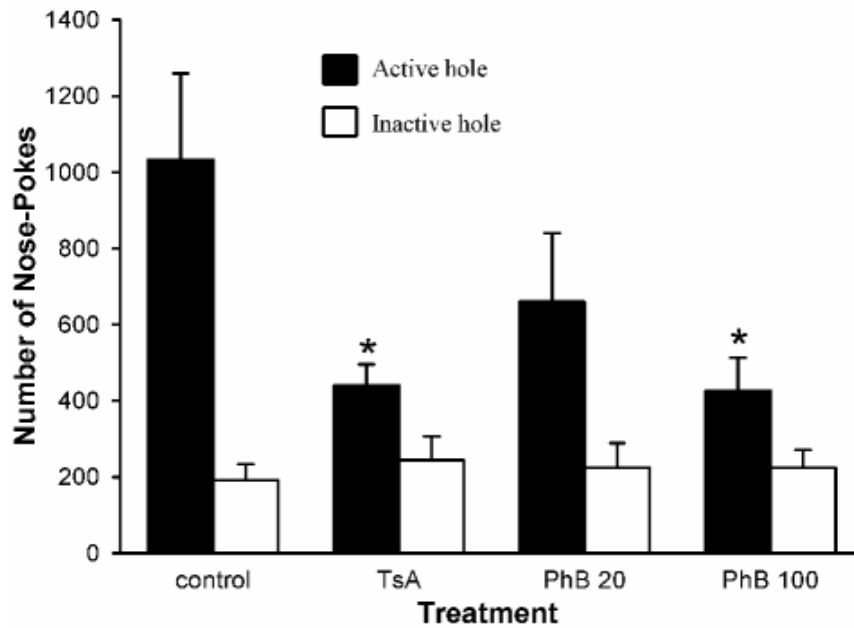


Fig. (2). Effect of TsA and PhB on the combination of cocaine- and cue-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior.

Rats were i.v. injected daily with vehicle or with the indicated HDAC inhibitor, beginning 4 days before the reinstatement session. They were treated again 30 min before being injected i.p. with 15 mg/kg cocaine and placed immediately in the self-administration chamber. Numbers of NPs, expressed as means \pm sem, realized in the active and inactive holes during the 1-h test session are shown. * $p < 0.05$, comparison between pharmacological and vehicle treatment (One-way Kruskal-Wallis ANOVA followed by Dunn's *post hoc* test).

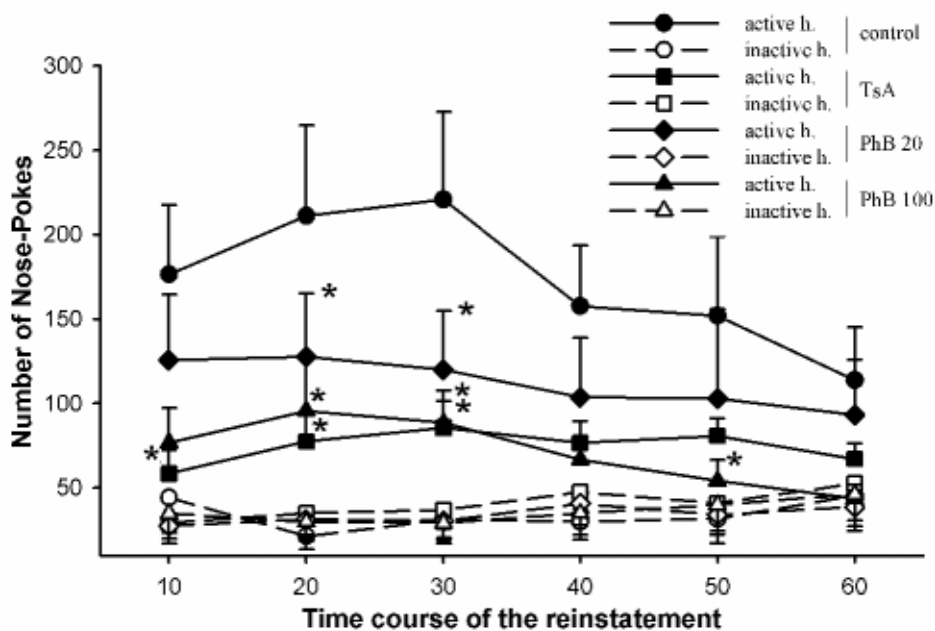


Fig. (3). Time-course of the effect of TsA and PhB on the combination of cocaine- and cue-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior.

Rats were treated as indicated in the legends to fig (1) and (2). Numbers of NPs, expressed as means \pm sem, realized in the active and inactive holes during 10-min intervals in the reinstatement session are shown. * $p < 0.05$, comparison between pharmacological and vehicle treatment (Two-way ANOVA, treatment X time for repeated measures, followed by the Holm-Sidak *post hoc* test).

3. Publication n°3

The Inhibition of Histone Deacetylases Abolishes Preference but not Aversion for Nicotine

Veronica Pastor, Lionel Host, Jean Zwiller, Ramon Bernabeu
(VP and LH contributed equally to this work)

Après avoir réussi à démontrer que les mécanismes de remodelage de la chromatine, plus particulièrement les enzymes HDAC, sont impliqués dans les effets à long terme induit par la cocaïne, nous avons étudié les effets de l'inhibition des HDAC sur les propriétés appétitives et aversives de la nicotine ainsi que sur l'expression des protéines MeCP2 et HDAC2. Pour cela nous avons utilisé le modèle animal de la CPP, induite chez le rat par la nicotine.

Nous avons démontré que le PhB (i.p. ; 100 mg/kg) abolit la CPP induite par l'injection de nicotine en sous-cutané (s.c. ; 0,21 mg/kg) sans pour autant moduler la CPA induite par une plus forte dose de nicotine (s.c. ; 2 mg/kg). Nos données immunohistochimiques suggèrent que la phosphorylation du facteur de transcription CREB est associée à l'établissement de la CPP, mais pas de la CPA et qu'elle n'est pas impliquée dans la réduction par le PhB de l'amplitude de la CPP. La CPP tout comme la CPA induisent l'expression des protéines MeCP2 et HDAC2 dans le CPU et la NAc. De façon intéressante l'expression de HDAC2 s'est trouvée réduite par le PhB dans ces structures chez les rats traités dans les conditions qui amènent à l'installation d'une préférence, montrant un parallélisme entre les effets du PhB sur le comportement des rats et sur l'expression de HDAC2. Les inhibiteurs de HDAC altèrent les propriétés discriminatives de la nicotine et permettent de faire la distinction entre la préférence et l'aversion à cette drogue.

Abstract

It is now recognized that chromatin remodeling is a key cellular mechanism integrating environmental stimuli with changes in gene expression. The mechanism has been shown to occur also in the central nervous system to underlie long-term effects of drugs of abuse. Histone acetylation resulting from the binding of histone deacetylases (HDACs) to methyl CpG binding proteins (MeCP2) is a well characterized mechanism responsible for defining the degree of chromatin compaction, therefore modulating the accessibility of DNA to regulatory proteins. Nicotine causes long-term synaptic changes in the nervous system, but little is known concerning the mechanisms involved in nicotine preference. Previous results have shown that cAMP-response element-binding protein (CREB) activation is involved in the establishment of nicotine-conditioned place preference (CPP). In the present study, we used a biased CPP protocol to demonstrate that the histone deacetylase inhibitor phenylbutyrate was able to dramatically reduce the preference for nicotine, without altering the aversive properties of the drug. We measured immunohistochemically the expression of phospho-CREB, HDAC2 and MeCP2 in mesocorticolimbic areas of rats that displayed nicotine-conditioned place preference or place aversion and that were treated with the HDAC inhibitor. The data suggest that phospho-CREB is necessary to establish CPP, but it is not involved in the reduction of nicotine-preference in response to phenylbutyrate. They also show that HDAC2 expression in response to phenylbutyrate in all the subregions of the striatum examined mirrors the behavioral effects of the inhibitor, suggesting that HDAC2 is involved in promoting synaptic plasticity underlying the preference for nicotine.

Introduction

Nicotine, the primary psychoactive component of tobacco smoke, is believed to be responsible for the development and maintenance of tobacco dependence. It acts on nicotinic acetylcholine receptors that cooperate with other neurotransmitter systems to modulate synaptic plasticity (Dajas-Bailador & Wonnacott, 2004). By binding to nicotinic receptors in the ventral tegmental area (VTA), nicotine stimulates the activity of dopaminergic neurons that project to cortical and limbic regions (Dani & Heinemann, 1996; Mansvelder & McGehee, 2000; Laviolette & Van der Kooy, 2004). Even a few exposures to nicotine induce long-lasting alterations in the mesolimbic system that probably underlie early steps of nicotine dependence (Radcliffe *et al.*, 1999; Girod *et al.*, 2000; Mansvelder *et al.*, 2002).

Current therapeutic interventions for quitting smoking are not quite satisfactory. Improvement of therapeutics necessitates better understanding of the mechanisms that underlie the addictive properties of nicotine (Vaszar *et al.*, 2002). Unfortunately, not much is known about the mechanisms initiated by nicotine-induced activation of the mesolimbic pathway that would ultimately be responsible for long-lasting neuroadaptations. Such adaptations most probably require genome-wide alterations in gene transcription (Renthal & Nestler, 2009). We recently reported that nicotine-induced preference and reinstatement in rats require an enhanced phosphorylation state of cAMP-response element-binding protein (CREB) (Pascual *et al.*, 2009; see also Walters *et al.*, 2005; Brunzell *et al.*, 2009). Phospho-CREB binds the CREB-binding protein CBP, a transcriptional coactivator which possesses histone acetyltransferase activity (Goodman & Smolik, 2000; Kalkhoven, 2004). CBP together with histone deacetylases (HDACs) play an important role in activating CREB through chromatin remodeling in response to a variety of signaling molecules (Liu *et al.*, 2008). In general, increased histone acetylation is associated with DNA relaxation and elevated transcriptional activity.

On the other hand, gene regulation in response to repeated cocaine administration has been shown to induce long-term cellular alterations, which are partially under the control of epigenetic factors, such as HDACs (Cassel *et al.*, 2006; Renthal & Nestler, 2009). HDACs are recruited by a complex that includes the transcriptional repressor MeCP2 (methyl-CpG-binding protein 2) bound to methylated DNA. Gene silencing brought about by MeCP2 can be reversed by HDAC inhibitors, through chromatin remodeling (Jones *et al.*, 1998; Dobosy & Selker, 2001; Butler & Bates, 2006). The use of HDAC inhibitors has therefore rapidly emerged from the literature as a powerful tool to study the role of chromatin remodeling in

transcriptional regulation (MacDonald & Roskams, 2009). Hyper-acetylation of histones via HDAC inhibition has been shown to convert short-term into long-term memory (Vecsey *et al.*, 2007; Guan *et al.*, 2009; Stefanko *et al.*, 2009). Since memory for nicotine-associated cues are highly resistant to extinction, contributing to the high rate of relapse among tobacco addicts (Berke & Hyman, 2000; Kelley, 2004; Hyman, 2005; Pascual *et al.*, 2009), it is likely that some HDACs are involved in nicotine-induced long-term effects.

In the present study, we evaluated whether the HDAC inhibitor phenylbutyrate (PhB) would modify the nicotine-induced place preference or place aversion. Changes in CREB phosphorylation, HDAC2 and MeCP2 gene expression were investigated in parallel.

Material and Methods

Animals

Male Sprague-Dawley rats weighing 100-140 g (30 to 35 days old) were housed by groups of four on a 12 h light/dark cycle with *ad libitum* access to food and water. The housing conditions and animal care were consistent with those specified in the *Guide for the care and use of laboratory animals*. All procedures were performed during the light part of the diurnal cycle. Rats were handled for 5 days prior to behavioral conditioning. The animals were sacrificed 3 h after the first CPP (nicotine and control groups, n = 6 and 5, respectively) or CPA (nicotine and control groups, n = 7 and 5, respectively), and after PhB administrated in CPP (nicotine and control groups, n = 6 and 5, respectively) or CPA animals (nicotine and control groups, n = 7 and 6, respectively).

Drugs

Rats undergoing CPP or conditioned place aversion (CPA) were injected subcutaneously (s.c.) with 0.21 mg/kg nicotine (Sigma-Aldrich) for CPP, and with 2 mg/kg for CPA in a volume of 1 ml/kg body weight. An equal volume of phosphate buffered saline (PBS) was injected for the control condition. Indicated doses are based on the molecular weight of the freebase. For treatment with the HDAC inhibitor, animals were i.p. injected each conditioning day with PBS or with 100 mg/kg PhB (Sigma-Aldrich) 30 min prior to PBS or nicotine injection.

Biased Place Conditioning

Place conditioning was performed in home-made boxes divided into two equally sized compartments (30 x 25 x 30 cm). A partition separated the two compartments with an opening door that allows access to either side of the box. This partition was closed during conditioning days. The two compartments had different visual, tactile and olfactory cues: one compartment had horizontally striped black and white walls and a wire mesh floor above pine shavings; the other compartment had vertically striped black and white walls and a bar-grid floor above cedar shavings. During the habituation period, animals were handled twice a day for 5 days and were injected s.c. with PBS to habituate them to the injections. A biased CPP protocol was used in all behavioral procedures (Le Foll & Goldberg, 2005; Tzschentke, 2007).

Preconditioning Phase - On day 1 after habituation, animals were injected with PBS and placed in the box with the door open, which allowed them to roam freely from side to side for 10 min, and the time spent in each compartment was recorded. Balanced groups of animals showing approximately equal bias were constituted from the data.

Conditioning Phase - On conditioning days, the two compartments were separated by the partition (door closed). Animals were injected twice a day, in the morning with PBS and in the afternoon with PBS or nicotine. Control group was given PBS in both compartment and drug groups received nicotine in one compartment and PBS in the other compartment. For CPP, nicotine was given in the initially non-preferred compartment and for CPA in the initially preferred compartment. Conditioning sessions of 20 min were carried on for 4 consecutive days.

Test Phase - On day 6, animals were tested after they were given a PBS injection. They were allowed to roam freely between the two compartments for 10 min with the door open. Time spent in each compartment was recorded.

Data analysis - The time spent in each compartment was converted into a preference/avoidance coefficient (1998). Positive values of the coefficient indicate a preference for the drug-paired compartment or CPP, while negative values indicate an aversion to the drug-paired compartment or CPA. Significant effects between groups were determined by analyzing conditioning chambers as a within-subject measure (nicotine paired vs PBS paired), using one-way ANOVA, followed by Student-Newman-Keuls *post hoc* tests, when required. Data are expressed as mean \pm SEM, and significance was set at $P \leq 0.05$.

Antibodies

Rabbit polyclonal antibodies used: anti-Mecp2 antibody (Upstate, Millipore, Billerica, MA, USA; dilution 1:600); anti-pCREB antibody (Cell Signaling, Danvers, MA, USA; dilution 1:800); and anti-HDAC2 antibody (Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, CA, USA; dilution 1:500). Antibody binding was detected with secondary biotinylated horse anti-rabbit IgG.

Immunohistochemistry

Three hours after the CPP test, animals were anesthetized and perfused with 4% paraformaldehyde. Brains were removed and 50- μ m thick coronal sections were prepared. HDAC2, pCREB and MeCP2 immunostaining were performed as previously described (Cassel *et al.*, 2004; Pascual *et al.*, 2009). Briefly, sections were incubated overnight at 4°C with commercial primary antibodies directed either against phospho-CREB, HDAC2, and MeCP2. Sections were then incubated successively with biotinylated secondary antibody (Jackson ImmunoResearch Labs, West Grove, PA, USA) for 2 h at room temperature, and with an avidin-biotin-peroxydase complex (Vectastain Elite ABC Kit Universal, Vector Labs, Burlingame, CA, USA). Antibody labeling was detected using 3,3'-diaminobenzidine (DAB) and H₂O₂. Slices were dehydrated and coverslipped with mounting medium (Vector Labs). Numbers of DAB-stained cells were determined using a light microscope (Olympus, Center Valley, PA, USA) and the optical dissector principle (Gundersen *et al.*, 1988; Coggeshall *et al.*, 1996) for comparison between nicotine and vehicle groups. Quantification of immunolabeling for each antibody was performed in several brain structures using Image-Pro Plus (Media Cybernetics Inc., Bethesda, MD, USA) by an investigator blinded to the identity of the samples. Appropriate areas were digitally imaged and quantification was subjected to a stringent criterion (Miller & Marshall, 2005) according to the staining intensity. For each animal, immunopositive cells were counted in both hemispheres on 5 to 6 sections. Counts were averaged in squares of 0.5 mm² (depending of the structure) were drawn randomly in the prefrontal cortex (PFC), nucleus accumbens (NAc) core and shell, dorsal striatum (CPu) and VTA, and the counts were averaged for each immunopositive cell type per square millimeter. For quantification studies, statistical analyses were performed using one-way ANOVA (number of positive cells as factor of variation), followed by Student-Newman-Keuls *post hoc* tests, when required.

Results

Effect of PhB on nicotine-induced CPP and CPA

To examine the effects of HDAC inhibition on the development of nicotine-induced place preference or aversion, we trained rats in a well established biased CPP- or CPA-protocol. The results clearly show that 0.21 mg/kg of nicotine given once a day for 4 days was sufficient to induce an important CPP (Fig. 1). When 100 mg/kg PhB was injected 30 min before each conditioning session, the preference for nicotine was abolished. In contrast, while 2 mg/kg of nicotine given during 4 days of conditioning sessions induced a clear CPA as previously reported, the administration of the same PhB dosage 30 min prior to each conditioning session had no significant effect on the aversive properties of nicotine (Fig. 1).

Phospho-CREB levels in dopaminergic brain areas

Fig. 2 shows quantitative analysis of pCREB-positive cells expressed in several dopaminergic brain areas of rats that had been subjected to CPP and CPA and treated with PhB, at the dose and timing indicated in Fig. 1. The areas examined were the CPu, NAc core and shell, PFC and VTA. Significant differences across experimental groups could be established (CPu $F_{4,22} = 10.22$, $P < 0.0001$; NAc core $F_{4,22} = 6.45$, $P < 0.0021$; NAc shell $F_{4,23} = 13.51$, $P < 0.0001$; PFC $F_{4,25} = 13.06$, $P < 0.0001$; VTA $F_{4,22} = 18.93$, $P < 0.0001$). In the PFC, the number of pCREB-positive cells in the CPP and CPP+PhB groups was different from that found in the control group ($P < 0.001$ and $P < 0.05$, respectively). A significant difference was noticed between the CPP and CPP+PhB groups ($P < 0.05$). In the NAc core and shell, the CPP group expressed numbers of pCREB-positive cells that were significantly different from those expressed in control animals ($P < 0.01$). Animals from the CPP+PhB group also displayed a different labeling when compared to control animals ($P < 0.05$ for NAc core and $P < 0.01$ for NAc shell). In the CPu, significant differences were observed between control and CPP, CPP+PhB or CPA+PhB groups of rats ($P < 0.001$, $P < 0.05$ and $P < 0.05$, respectively). In the VTA, the CPP, CPP+PhB and CPA+PhB groups displayed significant differences in the number of immunoreactive cells when compared to control ($P < 0.001$, $P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively). Importantly, the CPA+PhB group showed a significant difference in labeling when compared to CPA animals ($P < 0.05$). The CPA group showed a significantly lower level of pCREB positive cells in all the structures examined, when compared to the CPP group.

HDAC2 expression in the nucleus accumbens and dorsal striatum

Fig. 3 summarizes the quantitative analysis of the number of HDAC2-immunoreactive cells in the CPu, NAc core and shell and PFC of groups of rats treated as indicated above. One-way ANOVA indicated significant differences between groups (CPu $F_{5,27} = 8.90$, $P < 0.0001$; NAc core $F_{5,27} = 8.57$, $P < 0.0001$; NAc shell $F_{5,31} = 9.24$, $P < 0.0001$ and PFC $F_{5,29} = 0.885$, $P = 0.50$). In comparison to control rats, immunoreactivity in the NAc core was statistically different in the CPP, CPA and CPA+PhB groups of rats ($P < 0.01$). The CPP+PhB group exhibited significantly different labeling when compared to CPP groups of rats ($P < 0.05$). Very similar results were obtained in the NAc shell and in the CPu. No significant difference was found between the various behavioral groups in the PFC.

MeCP2 expression in the nucleus accumbens and dorsal striatum

Fig. 4 shows the quantitative analysis of the number of MeCP2-immunopositive cells in the CPu, NAc core and shell and PFC of the same groups of rats. One-way ANOVA indicated significant differences between groups (NAc core $F_{5,32} = 10.09$, $P < 0.0001$; NAc shell $F_{5,29} = 13.23$, $P < 0.0001$; CPu $F_{5,25} = 10.44$, $P < 0.0007$; and PFC $F_{5,29} = 1.56$, $P = 0.20$). In the NAc core, animals from the control group displayed significantly different number of MeCP2-immunoreactive cells than animals from the CPP, CPP+PhB, CPA and CPA+PhB groups ($P < 0.001$, $P < 0.001$, $P < 0.05$, and $P < 0.01$, respectively). In the NAc shell, MeCP2 labeling in the CPP group was different from that observed in the control group ($P < 0.001$). Control rats also displayed a significantly different labeling when compared to the CPP+PhB, CPA, and CPA+PhB groups ($P < 0.05$). In the CPu number of immunopositive cells in the CPP, CPA and CPA+PhB groups was significantly different when compared to control group ($P < 0.01$, $P < 0.001$ and $P < 0.01$, respectively). Statistically significant difference was also found between the CPP and the CPP+PhB groups ($P < 0.05$). It is noteworthy that animals of the CPA group showed no difference in MeCP2 expression in the three structures examined, when compared to the nicotine-CPP group of animals. No significant difference was found between the various behavioral groups in the PFC.

Immunohistochemical studies showing pCREB, HDAC2 and MeCP2 in NAc core from the different behavioral groups

Fig. 5 illustrates pCREB, HDAC2 and MeCP2 immunoreactivity in the NAc core of control, CPP and CPA animals, with or without the administration of HDAC inhibitor PhB. Immunostaining of pCREB, HDAC2 and MeCP2 was restricted to the nuclear compartment,

in agreement with the proteins binding directly or indirectly DNA. Difference in the number of positive cells could be observed for pCREB in CPP and CPP+PhB, whereas for HDAC2 in CPP, CPA and CPA+PhB. In section adjacent from the same rat brains, MeCP2-positive cells were increased in CPP, CPP+PhB, CPA and CPA+PhB groups of animals. All the markers showed a clear staining and distribution. The quantification was showed in the previous figures.

Discussion

In the present study, we evaluated the effect of an HDAC inhibitor on the consolidation of nicotine-conditioned place preference in rats. It is shown that inhibition of HDACs was sufficient to reduce the place preference for nicotine. CPP is a classical conditioning test that is usually utilized to measure preference for drugs. We used here a biased protocol to establish CPP (Tzschentke, 1998, 2007; Le Foll & Goldberg, 2005), since biased assignment procedures are more effective when nicotine is used to induce preference (Calcagnetti & Schechter, 1994; Le Foll & Goldberg, 2005; Pascual *et al.*, 2009; Brunzell *et al.*, 2009). The fact that the HDAC inhibitor PhB dramatically reduced CPP suggests that nicotine-associated cues are under the control of neurobiological mechanisms that involve histone acetylation processes. Administration of higher doses of nicotine is known to induce place aversion (Tzschentke, 2007; Le Foll & Goldberg, 2005), which was not found to be affected by the administration of the same dosage of PhB. Together, the data indicate that the mechanisms underlying CPP and CPA instatement are quite different and suggest that HDAC inhibition can discriminate between the establishment of preference or aversion to nicotine.

In order to get some clues for understanding the neurobiological mechanisms underlying the distinct effect of PhB on CPP and CPA, we measured the expression of phospho-CREB, HDAC2 and MeCP2 proteins in mesolimbic dopaminergic brain areas of rats that underwent the behavioral tests. Data showing pCREB expression confirm a previous observation, i.e. that the transcription factor CREB is highly phosphorylated during CPP, but not during CPA (Pascual *et al.*, 2009). Furthermore, with the exception of the PFC, the number of cells expressing pCREB in animals displaying CPP or CPA was not modified by the administration of the HDAC inhibitor PhB. The latter observation suggests that, while pCREB is necessary to establish CPP as shown previously (Pascual *et al.*, 2009), it plays no essential role in the reduction of CPP in response to the HDAC inhibitor. On the other hand, phospho-CREB level was not modified during the acquisition of CPA and PhB had no effect

on pCREB level in the aversion test, strongly suggesting that pCREB does not participate in the aversive properties of nicotine. This is in contrast with a report showing that the administration of an HDAC inhibitor increased CREB activity and memory in a fear conditioning protocol (Vecsey *et al.*, 2007; Bredy & Barad, 2008; Miller *et al.*, 2008; Stefanko *et al.*, 2009). A possible reason for the apparent discrepancy might be that some brain structures involved in the reinforcing properties of drugs of abuse do not participate in the consolidation of aversive memories. These brain areas would respond in opposite way to HDAC inhibitors, by facilitating aversive memory, but not the aversive behavior associated with high doses of nicotine intake.

We also measured immunohistochemically the expression of HDAC2 in the same groups of animals. The data show for the first time that nicotine-induced CPP and CPA are associated with an increase in HDAC2 expression. This is in line with a previous report in which we showed that repeated cocaine treatment induced HDAC2 expression in PFC and striatum (Cassel *et al.*, 2006). The finding further establishes that HDAC2 participates in synaptic plasticity associated with behavior (Miczek *et al.*, 2008; Covington *et al.*, 2009; Guan *et al.*, 2009). Interestingly, while treatment with PhB had no effect in the control group, it was able to considerably reduce the number of HDAC2 immuno-positive cells in the striatal subregions of rats from the CPP group, but not from the CPA group. In both core and shell subregions of the NAc, a similar level of HDAC2-positive cells was found in the CPP, CPA and CPA + PhB groups of rats. The expression of HDAC2 actually clearly reflects the behavioral effects of the inhibitor, suggesting that HDAC2, a highly expressed HDAC in the brain, is involved in promoting synaptic plasticity in the striatum that underlies the preference for nicotine. The fact that HDAC2 expression was associated to CPP instatement strongly suggests that silencing of some genes was required in order to establish the conditioning. This is actually confirmed when considering that CPP was abolished by HDAC inhibition, known to increase gene transcription (Marushige, 1976; Clayton *et al.*, 2006).

HDAC2 is recruited in a complex composed also of Sin3A and MeCP2 bound to methylated DNA, with HDAC activity conferring transcriptional silencing to the corresponding genes (Yang & Seto, 2008). Gene silencing can be relieved by the inhibition of HDAC, since this causes chromatin remodeling allowing transcriptional activation (Buchwald *et al.*, 2009; Stefanko *et al.*, 2009). We therefore measured MeCP2 protein expression in the same behavioral groups. Again, as was the case when rats were treated with cocaine (Cassel *et al.*, 2006), we found that nicotine administration increased the number of cells expressing MeCP2 throughout the striatum. Pre-treatment with PhB was found to reduce MeCP2

expression only in the shell part of the NAc, when compared to the CPP group. As for HDAC2 expression, MeCP2 expression was not different in animals displaying CPA and treated with PhB.

Repeated treatment of rats with amphetamine and an HDAC inhibitor has been shown to reduce the formation of HDAC-CREB protein complex in the striatum (Shen *et al.*, 2008). Moreover, it was previously reported that hyperacetylating histones through HDAC inhibition converts short-term into long-term memory that does not persist beyond normal memory (Stefanko *et al.*, 2009; Vecsey *et al.*, 2007). More recently, it was demonstrated that HDAC2 actually regulates memory (Guan *et al.*, 2009). Nicotine-associated CPP is known for being very difficult to extinguish. Yet, the administration of PhB before the conditioning sessions was able to abolish the preference. Since PhB shows no marked specificity towards the various classes of HDACs, except for the sirtuins, the data demonstrate that one or several HDAC(s) are involved in the maintenance of drug-associated preference; they could represent key regulator(s) of long-term synaptic plasticity induced by nicotine. Interestingly, we already demonstrated that inhibition of HDACs reduced cocaine self-administration and attenuated the motivation of rats for cocaine (Romieu *et al.*, 2008). Moreover, a recent report showed that administration of an HDAC inhibitor facilitates the extinction of cocaine-induced CPP and reduces its reactivation (Malvaez *et al.*, 2009). Taken together, the data indicate a convincing effect of HDAC inhibition of drug-seeking behavior, suggesting that HDAC inhibitors represent a potential treatment against drug addiction.

Acknowledgements

The collaborative work between the Argentinean and the French labs was made possible thanks to the ECOS-Sud program A05S03. The work was also funded by CONICET and the Agencia Nacional de Ciencia y Tecnología grants.

References

- Berke, J. D. & Hyman, S. E. (2000) Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. *Neuron*, **25**, 515-532.
- Bredy, T.W. & Barad, M. (2008) The histone deacetylase inhibitor valproic acid enhances acquisition, extinction, and reconsolidation of conditioned fear. *Learn Mem.*, **15**, 39-45.
- Brunzell, D.H., Mineur, Y.S., Neve, R.L. & Picciotto MR (2009) Nucleus accumbens CREB activity is necessary for nicotine conditioned place preference. *Neuropsychopharmacology*, **34**, 1993-2001.
- Buchwald, M., Krämer, O.H. & Heinzl, T. (2009) HDACi--targets beyond chromatin..*Cancer Lett.*, **280**, 160-167.
- Butler, R. & Bates, G.P. (2006) Histone deacetylase inhibitors as therapeutics for polyglutamine disorders. *Nat Rev Neurosci.*, **7**, 784-796.
- Calcagnetti, D.J. & Schechter, M.D. (1994) Nicotine place preference using the biased method of conditioning. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, **18**, 925-933.
- Cassel, S., Revel, M. O., Kelche, C. & Zwiller, J. (2004) Expression of the methyl-CpG-binding protein MeCP2 in rat brain. An ontogenetic study. *Neurobiol Dis.*, **15**, 206-211.
- 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.
- Clayton, A. L., Hazzalin, C. A. & Mahadevan, L.C. (2006) Enhanced histone acetylation and transcription: a dynamic perspective. *Mol Cell*, **23**, 289-296.
- Cogesshal, R. E. & Lekan, H. A. (1996) Methods for determining numbers of cells and synapses: a case for more uniform standards of review. *J Comp Neurol.*, **364**, 6-15.
- Covington, H. E. 3rd, Maze, I., LaPlant, Q. C., Vialou, V. F., Ohnishi, Y. N., Berton, O., Fass, D. M., Renthal, W., Rush, A. J. 3rd, Wu, E. Y., Ghose, S., Krishnan, V., Russo, S. J., Tamminga, C., Haggarty, S. J. & Nestler, E. J. (2009) Antidepressant actions of histone deacetylase inhibitors. *J Neurosci.*, **29**, 11451-11460.
- Dajas-Bailador, F. & Wonnacott, S. (2004) Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends Pharmacol Sci.*, **25**, 317-324.
- Dani, J. A. & Heinemann, S. (1996) Molecular and cellular aspects of nicotine abuse. *Neuron*, **16**, 905-908.
- Dobosy, J. R. & Selker, E. U. (2001) Emerging connections between DNA methylation and histone acetylation.. *Cell Mol Life Sci.*, **58**, 721-727.

- Girod, R., Barazangi, N., McGehee, D. & Role, L. W. (2000) Facilitation of glutamatergic neurotransmission by presynaptic nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology*, **39**, 2715-2725.
- Goodman, R. H. & Smolik, S. (2000) CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev.*, **14**, 1553-1577.
- Guan, J. S., Haggarty, S. J., Giacometti, E., Dannenberg, J. H., Joseph, N., Gao, J., Nieland, T. J., Zhou, Y., Wang, X., Mazitschek, R., Bradner, J. E., DePinho, R. A., Jaenisch, R. & Tsai, L. H. (2009) HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature*, **459**, 55-60.
- Gundersen, H. J., Bagger, P., Bendtsen, T. F., Evans, S. M., Korbo, L., Marcussen, N., Moller, A., Nielsen, K., Nyengaard, J. R. & Pakkenberg, B. (1988) The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*, **96**, 857-881.
- Hyman, S. E. (2005) Addiction: a disease of learning and memory. *Am J Psychiatry.*, **162**, 1414-1422.
- 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.
- Kalkhoven, E. (2004) CBP and p300: HATs for different occasions. *Biochem Pharmacol.*, **68**, 1145-1155.
- Kelley, A. E. (2004) Memory and addiction: shared neural circuitry and molecular mechanisms. *Neuron*, **44**, 161-179.
- Lavolette, S. R. & van der Kooy, D. (2004) The neurobiology of nicotine addiction: bridging the gap from molecules to behaviour. *Nat Rev Neurosci.*, **5**, 55-65.
- Le Foll, B. & Goldberg, S. R. (2005) Nicotine induces conditioned place preferences over a large range of doses in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, **178**, 481-492.
- Liu, X., Wang, L., Zhao, K., Thompson, P. R., Hwang, Y., Marmorstein, R. & Cole, P. A. (2008) The structural basis of protein acetylation by the p300/CBP transcriptional coactivator. *Nature*, **451**, 846-850.
- MacDonald, J.L., & Roskams, A. J. (2009) Epigenetic regulation of nervous system development by DNA methylation and histone deacetylation. *Prog Neurobiol.*, **88**, 170-183.

- Malvaez, M., Sanchis-Segura, C., Vo, D., Lattal, K. M. & Wood, M. A. (2009) Modulation of chromatin modification facilitates extinction of cocaine-induced conditioned place preference. *Biol Psychiatry*. [Epub ahead of print]
- Mansvelder, H. D. & McGehee, D. S. (2000) Long-term potentiation of excitatory inputs to brain reward areas by nicotine. *Neuron*, **27**, 349-357.
- Mansvelder, H. D., Keath, J. R. & McGehee, D. S. (2002) Synaptic mechanisms underlie nicotine-induced excitability of brain reward areas. *Neuron*, **33**, 905-919.
- Marushige, K. (1976) Activation of chromatin by acetylation of histone side chains. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **73**, 3937-3941.
- Miczek, K. A., Yap, J. J. & Covington, H. E. 3rd. (2008) Social stress, therapeutics and drug abuse: preclinical models of escalated and depressed intake. *Pharmacol Ther.*, **120**, 102-128.
- Miller, C. A. & Marshall, J. F. (2005) Molecular substrates for retrieval and reconsolidation of cocaine-associated contextual memory. *Neuron*, **47**, 873-884.
- Miller, C. A., Campbell, S. L. & Sweatt, J. D. (2008) DNA methylation and histone acetylation work in concert to regulate memory formation and synaptic plasticity. *Neurobiol Learn Mem.*, **89**, 599-603.
- Pascual, M. M., Pastor, V. & Bernabeu, R. O. (2009) Nicotine-conditioned place preference induced CREB phosphorylation and Fos expression in the adult rat brain. *Psychopharmacology (Berl)*, **207**, 57-71.
- Radcliffe, K. A., Fisher, J. L., Gray, R. & Dani, J.A. (1999) Nicotinic modulation of glutamate and GABA synaptic transmission of hippocampal neurons. *Ann N Y Acad Sci.*, **868**, 591-610.
- Renthal, W., Carle, T. L., Maze, I., Covington, H. E. 3rd, Truong, H. T., Alibhai, I., Kumar, A., Montgomery, R. L., Olson, E. N. & Nestler E. J. (2008) Delta FosB mediates epigenetic desensitization of the c-fos gene after chronic amphetamine exposure. *J Neurosci.*, **28**, 7344-7349.
- Renthal, W. & Nestler, E. J. (2009) Histone acetylation in drug addiction. *Semin Cell Dev Biol*, **20**, 387-394.
- 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.
- Shen, H. Y., Kalda, A., Yu, L., Ferrara, J., Zhu, J. & Chen, J. F. (2008) Additive effects of histone deacetylase inhibitors and amphetamine on histone H4 acetylation, cAMP

- responsive element binding protein phosphorylation and DeltaFosB expression in the striatum and locomotor sensitization in mice. *Neuroscience*, **157**, 644-655.
- Stefanko, D. P., Barrett, R. M., Ly, A. R., Reolon, G. K. & Wood, M. A. (2009) Modulation of long-term memory for object recognition via HDAC inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **106**, 9447-9452.
- Tzschentke, T. M. (1998) Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. *Prog Neurobiol.*, **56**, 613-672.
- Tzschentke, T. M. (2007) Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addict Biol.*, **12**, 227-462.
- Vaszar, L. T., Sarinas, P. S., Lillington, G. A. (2002) Achieving tobacco cessation: current status, current problems, future possibilities. *Respiration.*, **69**, 381-384.
- Vecsey, C. G., Hawk, J. D., Lattal, K. M., Stein, J. M., Fabian, S. A., Attner, M. A., Cabrera, S. M., McDonough, C. B., Brindle, P. K., Abel, T. & Wood, M. A. (2007) Histone deacetylase inhibitors enhance memory and synaptic plasticity via CREB:CBP-dependent transcriptional activation. *J Neurosci.*, **27**, 6128-6140.
- Walters, C. L., Cleck, J. N., Kuo, Y. C. & Blendy, J. A. (2005) Mu-opioid receptor and CREB activation are required for nicotine reward. *Neuron.*, **46**, 933-943.
- Yang, X. J. & Seto, E. (2008) The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, **9**, 206-218.

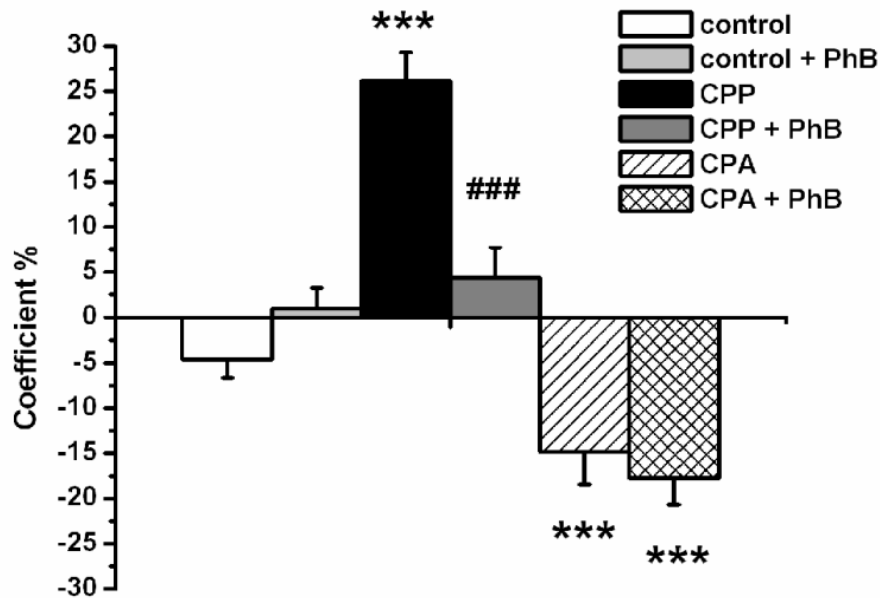


Figure 1. Effect of PhB on nicotine-induced CPP and CPA in rats.

CPP and CPA experiments were carried on as described in Material and methods. Rats were injected s.c. with 0.21 mg/kg nicotine for CPP, and with 2 mg/kg for CPA. An equal volume of PBS was injected for the control condition. Animals were i.p. injected each conditioning day with PBS or with 100 mg/kg PhB 30 min before PBS or nicotine injection, as indicated. Bar graphs indicate preference coefficients (positive values) or avoidance coefficients (negative values) for nicotine. Since nicotine was administrated in the initially non-preferred compartment for CPP, value for the coefficient is negative in the PBS control group. Values found in the CPA group are negative after pairing to the initially preferred compartment, showing the aversion for nicotine at the higher dosage. *** $P < 0.001$ comparison with the control group, ### $P < 0.001$ comparison with the corresponding nicotine-treated group. ANOVA followed by Student-Newman-Keuls *post hoc* test ($n = 5$ per group; mean \pm SEM).

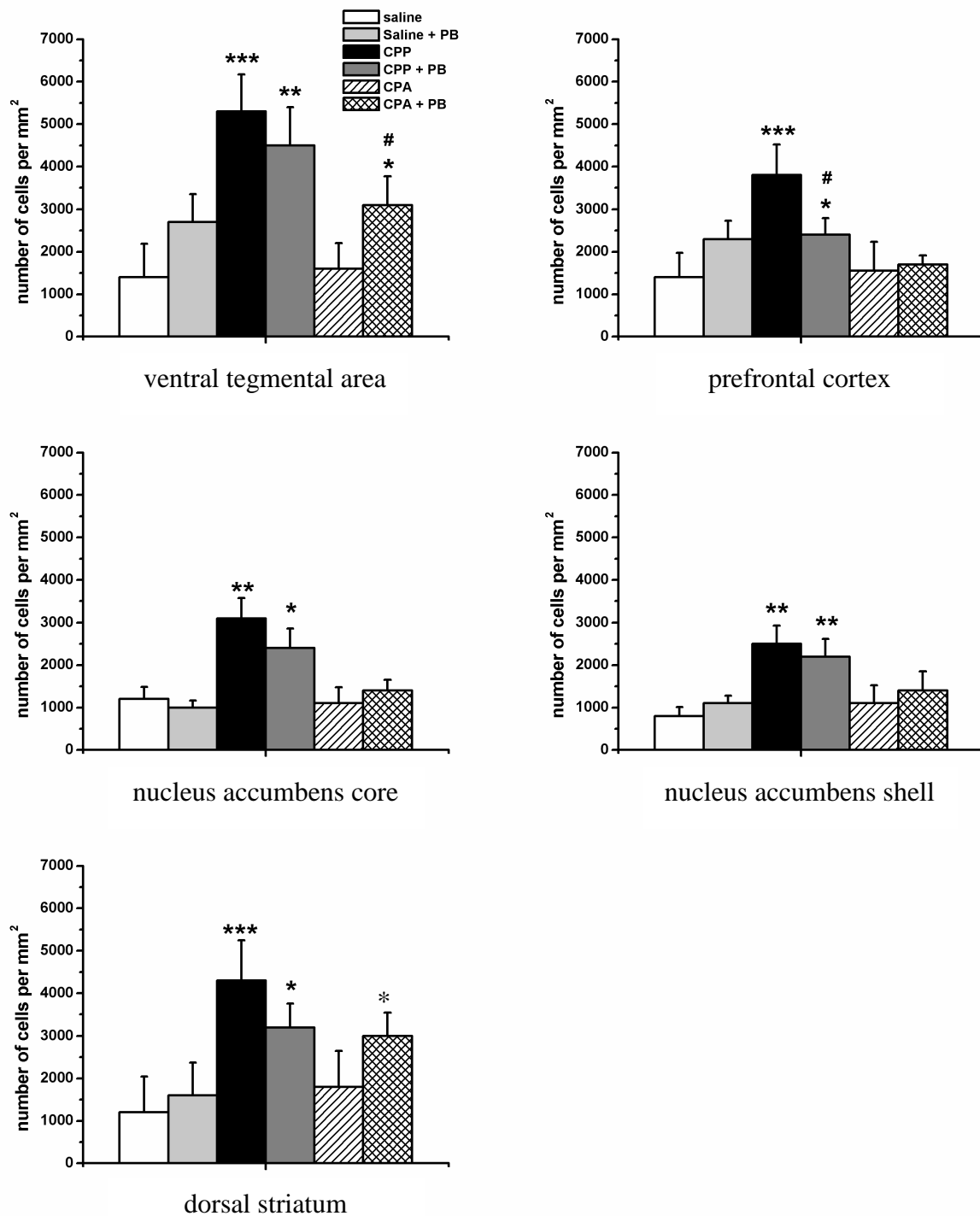


Figure 2. Quantification of pCREB-positive cells in dopaminergic brain structures.

Bar graphs indicate the number of pCREB-immunopositive cells/ mm² in the PFC, NAc core and shell, CPu and VTA throughout the various experimental groups of rats. Results are expressed as mean ± SEM for each group. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, and ****P* < 0.001, comparison with control group. #*P* < 0.05, comparison CPP or CPA with the corresponding PB-treated group. ANOVA followed by Student-Newman-Keuls *post hoc* test.

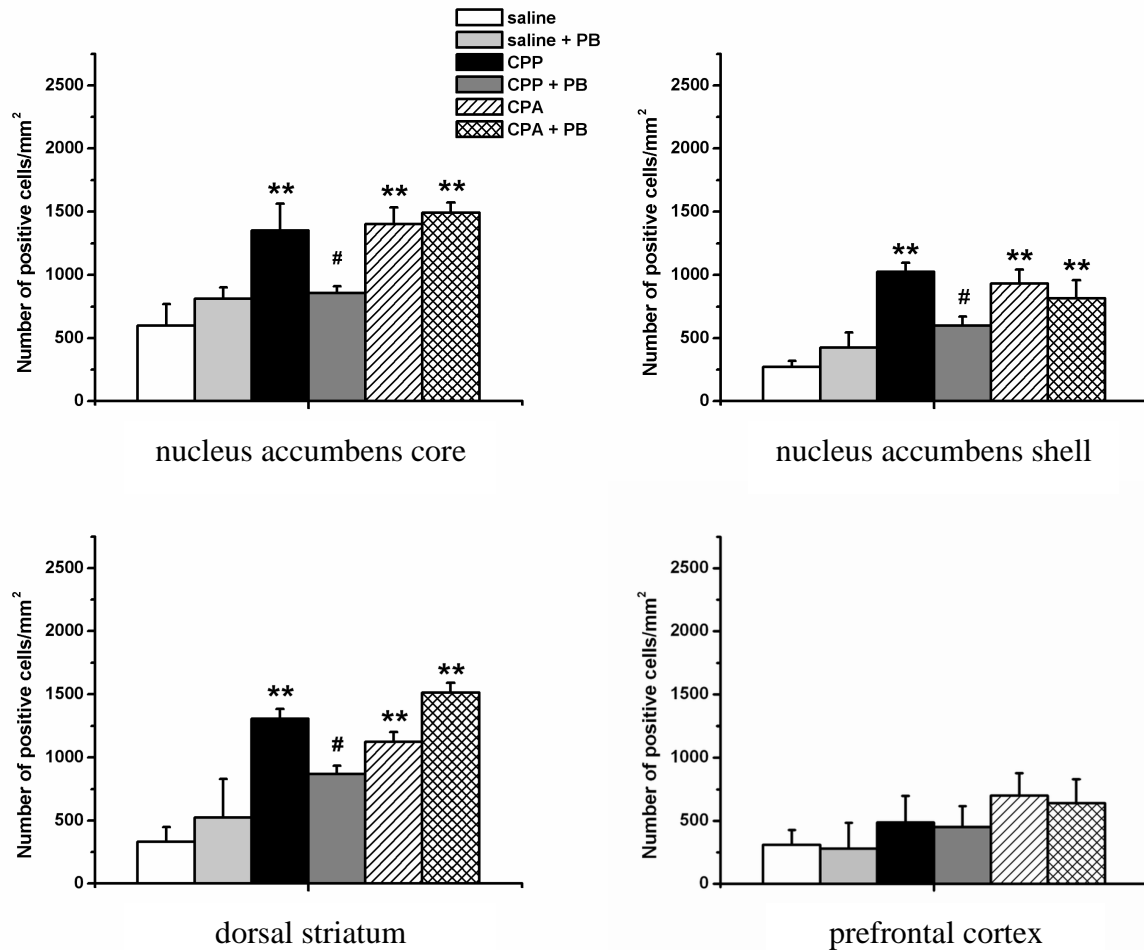


Figure 3. Quantification of HDAC2-immunoreactive cells in dopaminergic brain structures.

Bar graphs indicate the number of HDAC2-immunopositive cells/ mm² in the NAc core and shell, PFC and CPu in the various experimental groups. Results are expressed as mean \pm SEM. **P < 0.01, comparison with control group. #P < 0.05, comparison between CPP and CPP+PB groups. ANOVA followed by Student-Newman-Keuls post hoc test.

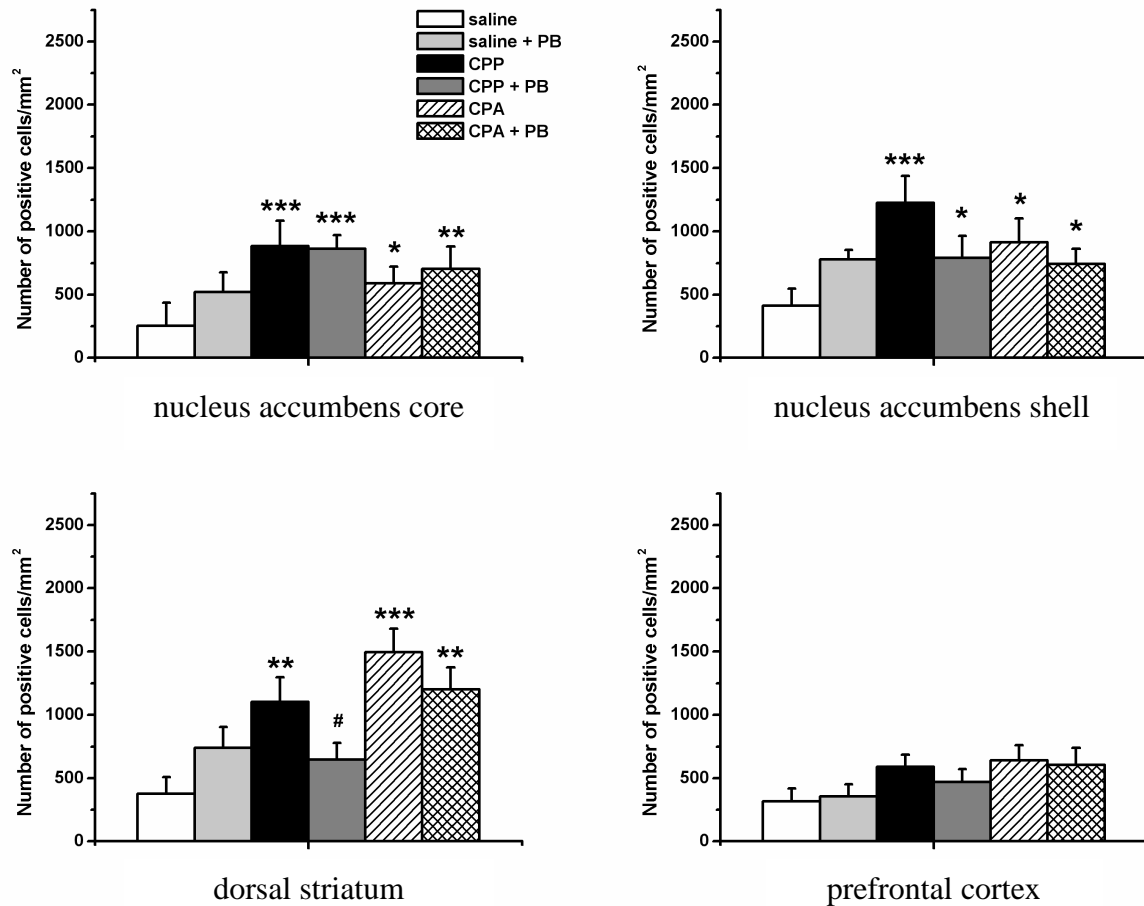


Figure 4. Quantification of MeCP2-immunoreactive cells in dopaminergic brain structures.

Bar graphs indicate the number of MeCP2-immunopositive cells/ mm² in the NAc core and shell, PFC and CPu in the various experimental groups. Results are expressed as mean \pm SEM. *P < 0.05, **P < 0.01, and ***P < 0.001, comparison with control group. #P < 0.05, comparison between CPP and CPP+PB groups. ANOVA followed by Student-Newman-Keuls post hoc test.

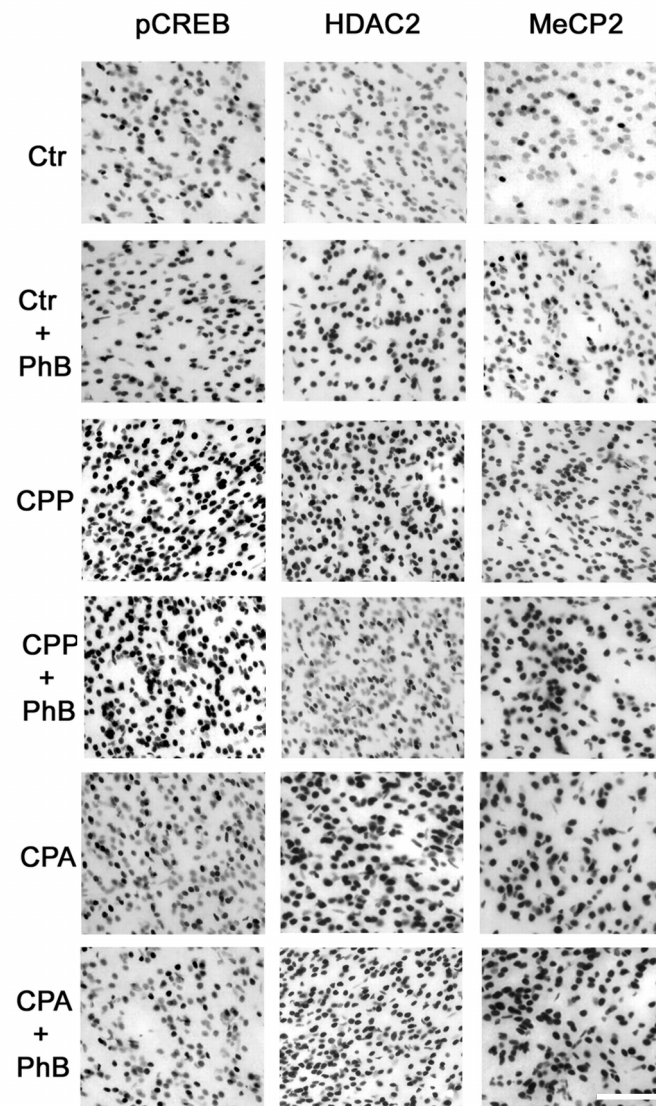


Figure 5. Photomicrographs showing pCREB, HDAC2 and MeCP2 immunoreactivity in NAc core from the different behavioral groups.

Pictures show representative pCREB-, HDAC2- and MeCP2-positive immunostaining in the NAc core area from control (Ctr), control + PhB (Ctr+PhB), CPP, CPP + PhB, CPA, and CPA + PhB groups of animals. Scale bar, 50 μ m.

4. Publication n°4

Cocaine self-administration alters the expression of chromatin-remodeling proteins; modulation by HDAC inhibition

Lionel Host, Jean-Bernard Dietrich, Delphine Carouge, Dominique Aunis, Jean Zwiller

Journal of Psychopharmacology, 2009 (sous presse)

La dépendance aux drogues est une maladie chronique du système nerveux se développant avec la répétition des prises et nécessitant la mise en place d'une plasticité synaptique. Ces adaptations nécessitent l'expression de gènes dits à réponse précoce et se mettent en place par des mécanismes liés aux régulations épigénétiques de la transcription des gènes. Certains des gènes dont la transcription est modifiée par les traitements utilisant des HDACi sont sans doute à même d'expliquer les mécanismes de plasticité induits par la consommation de drogue. Certaines de ces modifications neurobiologiques sous-tendent la diminution de la motivation des rats pour la drogue. Nous avons étudié l'effet de la TsA sur l'expression de MeCP2 et de différentes HDAC dans le CgCx, le NAc et le CPu chez des rats s'auto-administrant de la cocaïne en FR1.

Les résultats présentés dans l'article qui suit démontrent que l'AA de cocaïne augmente l'expression des protéines MeCP2, HDAC2 et HDAC11 et diminue la localisation nucléaire de HDAC5, plus particulièrement de la forme phosphorylée de HDAC5. Cette exportation nucléaire de phospho-HDAC5 en réponse à la drogue est corrélée à l'induction de la transcription du gène *MEF2C*. L'administration de TsA avant chaque session d'AA de cocaïne affecte principalement l'expression des gènes *MeCP2* et *HDAC11*. Une corrélation est notée entre les propriétés renforçantes de la cocaïne et les modifications de l'expression des protéines MeCP2 et MEF2C, principalement au niveau du NAc. Ces deux facteurs, connus pour réguler la transcription sont de bons candidats pour jouer un rôle dans les processus neurobiologiques induisant une diminution des propriétés renforçantes de la cocaïne et une diminution de la motivation des rats à en consommer.

Original Paper

Cocaine self-administration alters the expression of chromatin-remodelling proteins; modulation by histone deacetylase inhibition

Lionel Host, Jean-Bernard Dietrich, Delphine Carouge, Dominique Aunis and Jean Zwiller



Journal of Psychopharmacology
0(00) 1–8
© The Author(s) 2009
Reprints and permissions:
sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/0269881109348173
jop.sagepub.com



Abstract

Injection of the histone deacetylases inhibitor trichostatin A to rats has been shown to decrease the reinforcing properties of cocaine. In the present study, we investigated alterations in gene expression patterns in the anterior cingulate cortex, caudate-putamen and nucleus accumbens of rats self-administering cocaine and treated with trichostatin A. As recent studies highlighted the importance of chromatin remodelling in the regulation of gene transcription in neurons, we studied the expression of *Mecp2* and of several histone deacetylases. Cocaine self-administration was accompanied by an increased synthesis of *Mecp2*, HDAC2 and HDAC11 and by a decreased nuclear localization of HDAC5 and of the phospho-form of HDAC5, suggesting a nuclear export of this protein in response to the drug. The latter mechanism was further addressed by the demonstration of an enhanced expression of MEF2C transcription factor. Among the genes we examined, treatment with trichostatin A before each cocaine self-administration session was found to mostly affect *Mecp2* and *HDAC11* expression. A correlation was found between the modification of *Mecp2* and MEF2C gene expression and the reinforcing property of cocaine. The two factors known to regulate gene transcription are likely to play a role in the neurobiological mechanism underlying a decrease in the reinforcing properties of cocaine.

Keywords

cocaine self-administration, epigenetic regulation, HDAC, MEF2C, *Mecp2*, trichostatin A

Introduction

Drug dependence is characterized by compulsive drug-seeking and drug-taking behaviour, despite severe adverse consequences. Transition from controlled drug consumption to compulsive drug use requires persistent cellular adaptations in the brain reward system (Nestler, 2001; White and Kalivas, 1998). This ascending dopaminergic system emerging from the ventral tegmental area and projecting to the nucleus accumbens (NAc), the caudate-putamen (CPu) and the anterior cingulate cortex (CgCx) is thought to represent a key pathway by which psychostimulants, like cocaine, produce reinforcement (Di Chiara and Imperato, 1988; Roberts et al., 1977). Recent evidence suggests that drug-induced modifications of the chromatin structure may contribute to these long-lasting changes in gene expression and ultimately to addictive behaviour (Cassel et al., 2006; Levine et al., 2005; Renthal et al., 2007).

The main factor influencing chromatin compaction is the state of amino-acid residues within histone tails, which serve as targets for a variety of reversible post-translational modifications that modulate nucleosome structure and gene transcription (Berger, 2002). There are at least eight distinct types of dynamic modifications and over 60 different residues on histones where modifications have been found (Jenuwein and Allis, 2001; Kouzarides, 2007). Among them, the best characterized covalent modification is acetylation (de Ruijter et al., 2003), which is a reversible process that is governed

by the opposing actions of histone acetyltransferases (Roth et al., 2001) and histone deacetylases (HDACs) (Lopez-Rodas et al., 1993). In general, increased histone acetylation is associated with DNA relaxation and elevated transcriptional activity, whereas decreased acetylation results in tighter DNA coiling and gene silencing (Marushige, 1976). HDACs lack intrinsic DNA-binding activity and are recruited to target genes via their direct association with transcriptional activators and repressors like methyl CpG binding protein-2 (MeCP2) (Nan et al., 1998) and via their incorporation into large multiprotein transcriptional complexes (Walkinshaw et al., 2008).

The mammalian HDAC superfamily comprises 11 proteins that harbour a highly conserved deacetylase domain. These proteins can be classified into four families (class I, IIa, IIb and IV), which differ in structure, enzymatic function, subcellular localization and expression patterns (Haberland et al., 2009; Yang and Seto, 2008). HDAC 1, 2, 3 and 8 belong to the class I HDAC family. They are expressed

INSERM, U575, Centre de Neurochimie, Université de Strasbourg, Strasbourg, France.

Corresponding author:

Jean Zwiller, Unité INSERM U575, Centre de Neurochimie, 5 rue Blaise Pascal, 67084 Strasbourg Cedex, France.
Email: zwiller@neurochem.u-strasbg.fr

ubiquitously, localized predominantly to the nucleus and display high enzymatic activity toward histone substrates. HDAC 4, 5, 7 and 9 belong to the class IIa HDAC family (Verdin et al., 2003). They have large N-terminal extensions with conserved binding sites for the transcription factor myocyte enhancer factor-2 (MEF2) and for the chaperone protein 14-3-3. HDAC6, which forms the class IIb family together with HDAC10, is the main cytoplasmic deacetylase in mammalian cells and targets directly cytoskeletal proteins such as α -tubulin (Hubbert et al., 2002). HDAC11 is the only class IV HDAC (Gao et al., 2002). Expression of HDAC11 is enriched in the brain but very little is known about its function. It is composed of a deacetylase domain that shows homology to class I and II HDAC domains, with small N- and C-terminal extensions. Although little information is available to assign precise roles to individual HDAC isoforms, HDAC activity has been shown to be involved in several neurodegenerative diseases and psychiatric disorders, such as Huntington's disease (Hockly et al., 2003), Friedreich's ataxia (Herman et al., 2006) or depression (Schroeder et al., 2007).

In a previous study, we have shown that injection of the HDAC inhibitor trichostatin A (TsA) to rats was sufficient to decrease cocaine self-administration under a fixed-ratio 1 schedule of reinforcement (Romieu et al., 2008). The treatment also decreased their motivation to self-administer the drug, but not sucrose, under a progressive-ratio schedule of reinforcement. The aim of the present study was to compare the level of MeCP2 expression as well as that of several HDACs in dopaminergic brain areas of rats self-administering cocaine and treated with TsA, compared with rats taking only cocaine. We investigated the expression of HDAC2, HDAC5 and HDAC11 as these enzymes display the highest rat brain expression among class I, IIa and IV HDAC families, respectively (Broide et al., 2007).

Materials and methods

Animals

Male Wistar rats (Janvier, France), weighing 160–180 g, were housed in standard home cages (five rats per cage), with free access to food and water, under an inverted 12 h light–dark cycle (lights on at 7:00 p.m.). After surgery for catheter implantation into the jugular vein, animals were housed individually so that acoustic, olfactory and visual social contacts remained possible. They were allowed to recover for at least five days before the beginning of the drug self-administration test, which was conducted during the dark period. All procedures involving animal care were conducted in compliance with national laws and policies (Council directive 87/848, 1987, Service Vétérinaire de la Santé et de la Protection Animale; permission 67–165 to JZ) and with international guidelines (NIH publication 5586–23, 1985).

Pharmacological treatment

Cocaine hydrochloride (Cooper, France) solution was adjusted with NaCl 0.9% to infuse an intravenous (i.v.) dose of 0.33 mg/kg/injection for self-administration. TsA at 0.3 mg/kg (Sigma-Aldrich) or 10% DMSO vehicle solution

were administered i.v. 30 min before the beginning of each self-administration session.

Cocaine operant self-administration

Intravenous catheterization procedure into the jugular vein was performed according to (Caine et al., 1993). Drug self-administration was carried out as previously described (Romieu et al., 2008) in dark operant chambers (30 cm \times 30 cm \times 30 cm) located in a sound-attenuated room. Briefly, a computer-driven syringe pump (Imetronic, France) activated a 5-ml syringe and pushed fluid into silastic tubing connected to the catheter through its externalized 22-gauge guide cannula. Each chamber was equipped with two 3 cm-diameter holes on the same wall, located 4 cm above the floor; one was selected as the active hole for delivering the reinforcer and the other as the inactive hole. Disruption of an infrared photobeam in each hole (nose-poke) was detected. Nose-pokes into the inactive hole had no programmed consequence.

The procedure used was a fixed ratio 1 schedule of reinforcement that was carried out for four days during daily 2 h sessions (LeSage et al., 1999). In this schedule, each nose-poke into the active hole triggered the i.v. delivery of a 40 μ l cocaine solution over 2 s. A stimulus light, located 20 cm above the active hole was paired contingently with the delivery of cocaine and persisted during a 40 s time-out period. No cut-off was applied concerning the number of self-infusions the rat was able to perform during the session. Three different groups of rats were considered: animals self-administering cocaine and treated with vehicle or TsA 30 min before the self-administration session and an additional control group that received i.v. saline instead of cocaine in response to nose-pokes completed into the active hole.

Reverse transcriptase-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) analysis

For RT-qPCR analysis, rats were sacrificed 2 h after the fourth daily self-administration session by an overdose of pentobarbital (100 mg/kg, i.p.), brains were removed and total RNA was extracted from CgCx, CPu and NAc according to the procedure described (Chomczynski and Sacchi, 1987). Quality and quantity of the RNA were evaluated by measuring optical density at 260 and 280 nm and by gel electrophoresis. First strand cDNA was generated from 1 μ g of total RNA and random primers using Omniscript Reverse Transcriptase (QIAGEN, CA, USA) in a total volume of 20 μ l in a 1 h reaction at 37°C. The reaction product was used for RT-qPCR assay with a Light Cycler instrument and technology (Roche Applied Science, IN, USA) with Sybr Green I dye for detection and 0.2 μ M concentrations of appropriate primers. HDAC2 gene expression was measured using 5'-CCCTCAAACATGACAAACCA-3' as a forward primer and 5'-TGTCAGGGTCTTCTCCATCC-3' as a reverse primer. HDAC5 gene expression was measured using 5'-GCTGAGAACGGCTTTACTGG-3' as a forward primer and 5'-GGTGAGGTGCGAGTTGGTA-3' as a reverse primer. HDAC11 gene expression was measured

using 5'-TACAACCGCCACATCTACCC-3' as a forward primer and 5'-CCTCCTCACATTCCTCTCCA-3' as a reverse primer. *Mecp2* gene-specific PCR was measured using Rn_Mecp2_1_SG QuantiTect Primer Assay (QIAGEN). *MEF2C* gene expression was measured using 5'-CTGTCATCTCTGTCTGGCTTC-3' as a forward primer and 5'-GCGTGTGTTGTGGGTATCTC-3' as a reverse primer. PCR comprised an initial denaturation step of 10 min at 95°C, followed by 45 cycles; one cycle consisted of 10 s at 95°C, 5 s at 62°C and 12 s at 72°C. *36B4* gene was used as an internal control using 5'-GTGCCTCAC TCCATCATCAA-3' as a forward primer and 5'-TCCGA CTCTTCCTTTGCTTC-3' as a reverse primer. Its amplification was performed in the same conditions as those used for other transcripts except for an annealing temperature of 60°C. Quantitation of results was achieved using the Standard Curve Method in which a standard curve is first constructed from cDNA of known concentration. This curve is then used as a reference standard for extrapolating quantitative information for mRNA targets of unknown concentrations. Variation introduced due to variable RNA inputs, was corrected by normalization to the housekeeping gene *36B4*, encoding the acidic ribosomal phosphoprotein P0.

Antibodies

The following rabbit polyclonal antibodies were used, diluted in PBS: anti-HDAC2 (Santa Cruz Biotech., CA, USA) diluted 1:400; anti-HDAC5 (Abcam, UK) diluted 1:150; anti-Ser-259 phospho-HDAC5 (Abcam) diluted 1:150; anti-HDAC11 (Abcam) diluted 1:100; anti-Mecp2 (Upstate Biotech., NY, USA) diluted 1:250. A goat anti-MEF2C polyclonal antibody (Santa Cruz Biotech.) diluted 1:200 in PBS was also used. Antibody binding was detected with secondary biotinylated horse anti-rabbit IgG and revealed with an avidin-biotin-peroxidase complex (Vectastain Elite ABC Kit Universal, Vector Lab., CA, USA). For fluorescence microscopy, CY3-conjugated donkey anti-goat IgG (Jackson ImmunoResearch, PA, USA) or Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-rabbit IgG (Molecular Probes, OR, USA) were also used.

Immunohistochemistry

Groups of animals treated as described above for RT-qPCR analysis were used for immunohistochemistry. Two hours after the fourth self-administration session, rats were perfused transcardially with 1% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS; 0.1 M; pH 7.2; 250 ml). The brains were then kept overnight at 4°C in 15% sucrose, frozen in isopentane at -40°C and stored at -80°C. Coronal tissue sections (15-µm thick) were prepared using a Frigocut-E 2800 Cryostat (Reichert Microscope, NY, USA).

Immunohistochemistry was carried out essentially as described previously (Cassel et al., 2004). Following immunohistochemical labelling, sections were incubated for 15 min in 2.5 µM Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich) solution or in 7.5 µM Draq5 (Biostatus, UK) solution to label nuclei and coverslipped with Mowiol. Staining was observed under a fluorescent Leitz DM RB (Germany) binocular microscope,

with L-Plan ×10 ocular and Fluotar ×20 to ×40 objectives (Leica Microsystems, Germany). Photomicrographs were taken with an Axiocam camera (Zeiss, Germany). The percentage of immunoreactive cells in the CgCx, CPu, NAc core (NAcC) and NAc shell (NAcS) was calculated by counting an average of 800 to 1000 cells per brain structure in each section, by an investigator blinded to the identity of the samples. Two serial sections were considered per rat and values from four rats were used for statistical analysis. For immunofluorescence microscopy, sequential through-focus images of labeled cells were acquired using a confocal laser scanning microscope (LSM 510, Carl Zeiss, NY, USA) equipped with a Plan-Apochromat 63x oil immersion lens. Alexa Fluor 488 was excited using the 488 nm ray of the argon laser, whereas CY3 was excited with the 543 nm line of the helium/neon laser. Slight adjustments to photomicrographs were made only to the brightness and contrast, using PhotoImpact 11.0 (Ulead) software.

Statistical analysis

Results are expressed as means ± SEM. Effects of the HDAC inhibitors during the FR1 sessions were analysed by two-way ANOVA (treatment and session as factors of variation) between groups of rats. Quantifications of gene expression at both mRNA and protein levels were analysed by one-way ANOVA (treatment as factor of variation). Student-Newman-Keuls post hoc tests were performed when required and significance was set at $p \leq 0.05$.

Results

Cocaine self-administration alters the expression of *Mecp2* and HDACs; effect of TsA

In a previous study, we showed that TsA treatment of adult Wistar rats trained daily during cocaine self-administration sessions produced a reduction in their cocaine intake behaviour, the effect being statistically significant from the third session. We therefore used RT-quantitative PCR technology to measure mRNA expression of *Mecp2* and of several HDACs after four consecutive daily cocaine self-administration sessions (Table 1). Cocaine self-administration was found to increase the amount of *Mecp2* transcript by about three-fold in the CgCx and NAc and by about 2.4-fold in the CPu. Inhibiting HDACs with the general HDAC inhibitor TsA reduced *Mecp2* gene induction by 27% and 14% in the CgCx and NAc, respectively, but not in the CPu. We measured the expression of *HDAC2*, *HDAC5* and *HDAC11* genes, which encode representative members of class I, IIa and IV of HDACs, respectively. Whereas *HDAC5* gene expression was not modified in our experimental conditions, cocaine self-administration was associated with the induction of *HDAC2* in the three brain regions. The effect was of particular amplitude in the NAc, in which a 16-fold increase was noticed (Table 1). In contrast, *HDAC11* gene was not significantly induced in these brain structures. Treatment with TsA was found to reduce *HDAC2* expression. On the opposite, *HDAC11* gene was the only gene that was found to be strongly induced by TsA (a 2.3-fold increase was observed in the cortex).

Table 1. Messenger RNA expression of Mecp2, HDAC2, HDAC5 and HDAC11 measured by RT-qPCR analysis

	Saline	Cocaine + veh	Cocaine + TsA
Mecp2			
CgCx	100 ± 16	296 ± 30***	215 ± 22**#
CPu	100 ± 19	237 ± 31*	243 ± 31*
NAc	100 ± 8	308 ± 5***	265 ± 18***#
HDAC2			
CgCx	100 ± 6	316 ± 67*	297 ± 34*
CPu	100 ± 16	337 ± 57**	178 ± 33#
NAc	100 ± 27	1597 ± 159**	1211 ± 142**
HDAC5			
CgCx	100 ± 18	98 ± 23	116 ± 9
CPu	100 ± 5	96 ± 20	106 ± 11
NAc	100 ± 17	134 ± 18	143 ± 12
HDAC11			
CgCx	100 ± 18	125 ± 48	291 ± 57**#
CPu	100 ± 10	118 ± 5	164 ± 13*
NAc	100 ± 26	158 ± 28	228 ± 40*

Values, expressed as percentage of mRNA content in saline treated animals, are means ± SEM of mRNA levels in anterior cingulate cortex (CgCx), caudate-putamen (CPu) and nucleus accumbens (NAc) from rats self-administering cocaine ('Cocaine + veh') and rats treated with TsA before each self-administration session ('Cocaine + TsA') (n = 4 per group). *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 comparison with saline group; #p < 0.05 comparison between vehicle-treated and TsA-treated groups (ANOVA followed by Student-Newman-Keuls post hoc test).

Using immunohistochemistry, we next verified whether protein expression reflected the corresponding mRNA expression. Figure 1 illustrates protein expression in the CgCx of rats after four daily sessions of saline or cocaine self-administration. Another group of rats was treated with TsA 30 min before each self-administration session. Mecp2 and HDAC2 immunoreactivity were found exclusively in cell nuclei, in agreement with the proteins binding DNA or histones. The number of immunoreactive cells for both proteins was somewhat higher in rats that self-administered cocaine. Treating animals with TsA produced a reduction in the number of cells expressing Mecp2 but not HDAC2, when compared with rats self-administering cocaine only. As expected when considering a class II histone deacetylase, HDAC5 immunoreactivity was found in nuclear and cytoplasmic compartments under the saline control condition (Figure 1). In rats self-administering cocaine, it appeared that HDAC5 immunoreactivity was less present in nuclei, independently of the TsA treatment. Finally, HDAC11 immunoreactivity, which was found predominantly in cell nuclei, was increased in the CgCx of rats self-administering cocaine. Similarly to what we observed for the mRNA induction, the number of HDAC11-immunoreactive cells further increased in rats treated with TsA before each session.

Figure 2 shows a quantitative analysis of Mecp2, HDAC2, HDAC5 and HDAC11 expression in the CgCx, the CPu and in the core and shell subregions of NAc. The percentage of Mecp2-positive cells was significantly enhanced in rats self-administering cocaine (Figure 2A). The increase over control was 2.0-, 3.6-, 5.3- and 3.5-fold in the CgCx, CPu, NAc and

NAcS, respectively. Injection of TsA before each cocaine self-administration session reduced the cocaine-induced Mecp2 immunoreactivity in all structures, except in the NAcS. We observed a 53% decrease in the NAcC, compared with 11% decrease in the CPu. The percentage of HDAC2-positive cells was significantly enhanced in rats self-administering cocaine, but to a lesser degree when compared with Mecp2 (Figure 2A). The increase over control was 2.0-, 1.7-, 1.5- and 1.3-fold in the CgCx, CPu, NAcC and NAcS, respectively. Treating rats with TsA had no further effect on HDAC2 immunoreactivity. The percentage of HDAC11 positive cells was significantly enhanced in rats self-administering cocaine (Figure 2A). The increase over control was 4.0-, 2.2-, 2.8- and 1.9-fold in the CgCx, CPu, NAcC and NAcS, respectively. Injection of TsA before each cocaine self-administration session resulted in a further augmentation in HDAC11 immunoreactivity. The increase over the value found in the cocaine self-administering group ranged from 20% in the CPu to 56% in the NAcC. Globally, the results on Mecp2, HDAC2 and HDAC11 protein expression are in agreement with the data showing mRNA expression obtained by RT-qPCR (Table 1), with the exception of HDAC2 in the NAc, for which the mRNA, but not the protein, was found to be expressed at a particular high level in response to cocaine. For HDAC5 quantitative analysis, the percentage of nuclear labelling was assessed. Figure 2B shows that the percentage of immunopositive nuclei was reduced from 69%, 65%, 71% and 71% in control rats, to 27%, 31%, 38% and 38% in response to cocaine self-administration in the CgCx, CPu, NAcC and NAcS, respectively. Treating rats with TsA had no further effect on the percentage of nuclear labelling of HDAC5.

Induction of MEF2C by cocaine self-administration; involvement of phospho-HDAC5

As it is known that HDAC5 compartmentalization depends on its phosphorylation state, we followed HDAC5 phosphorylation, using a ser-259 phospho-specific antibody. Figure 3A shows phospho-HDAC5 immunofluorescence labelling in CgCx sections adjacent to those used in Figure 1. Under saline control conditions, phospho-HDAC5 was present in nucleus and cytoplasm. After four sessions of cocaine self-administration, phospho-HDAC5 immunoreactivity decreased in the nuclei and accumulated in the cytoplasm, in agreement with the notion that HDAC5, once phosphorylated, translocates from the nuclear compartment to the cytoplasm. A very similar labelling indicating HDAC5 translocation was also observed in the striatum (data not shown). When rats were repeatedly treated with TsA before the sessions, the distribution of phospho-HDAC5 labelling between the cellular compartments was not noticeably modified.

In order to convincingly demonstrate that phospho-HDAC5 indeed moved out of the nuclei in response to cocaine, rendering the MEF2C transcription factor active, we measured the expression of MEF2C protein. MEF2C induction is considered as an index of MEF2C activation by HDAC5 release from the chromatin, as the transcription factor is known to induce the transcription of its own gene.

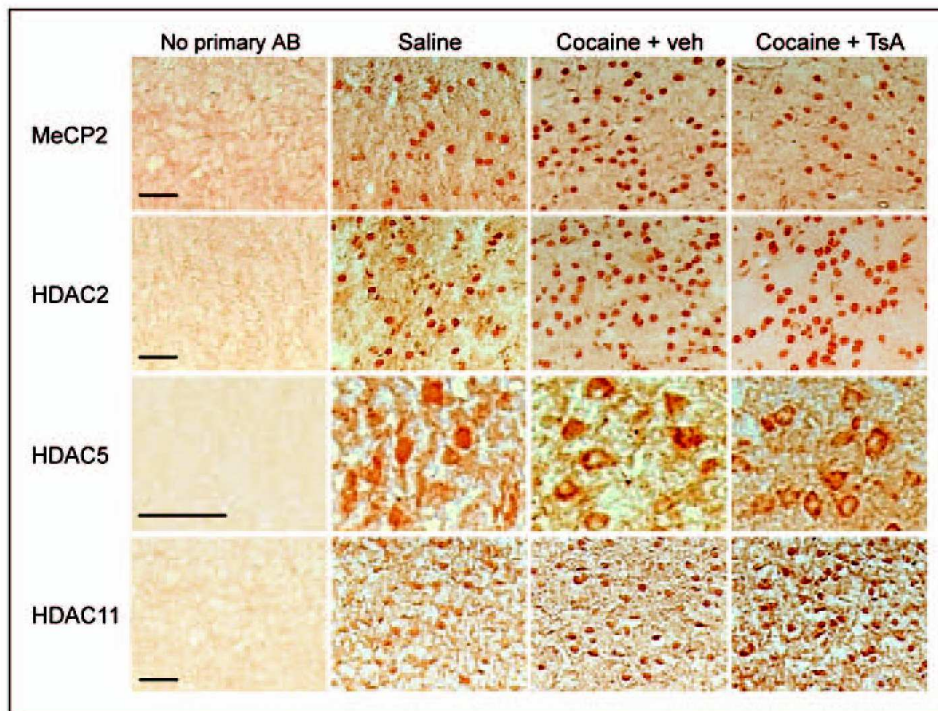


Figure 1. Expression of chromatin-remodelling proteins by cocaine. Photomicrographs showing Mecp2, HDAC2, HDAC5 and HDAC11 immunoreactivity in CgCx from rats self-administering saline ('Saline'), rats self-administering cocaine ('Cocaine+veh') and rats treated with 0.3 mg/kg TsA ('Cocaine+TsA') 30 min before each self-administration session ($n = 4$ per group). Animals were sacrificed 2 h after the 4th self-administration session. Coronal tissue sections (15 μ m) were incubated with rabbit polyclonal antibodies raised against Mecp2, HDAC2, HDAC5 and HDAC11. Antibody binding was detected with secondary biotinylated antibody and peroxidase reaction (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride and H_2O_2). 'No primary AB' refers to experiments in which the primary antibody was omitted. Scale bar, applicable to the four micrographs present in the same line, 50 μ m.

Figure 3B shows that expression of MEF2C, which was restricted to the nuclear compartment in agreement with the protein being a transcription factor, was clearly enhanced in CgCx of rats submitted to cocaine self-administration sessions and the TsA treatment did not significantly modify its expression. We also followed MEF2C mRNA expression level in the CgCx, CPu and NAc of rats treated under the same conditions, using RT-qPCR. Figure 4 shows that the amount of MEF2C transcript was increased after four days of cocaine self-administration by about 2.0-, 2.8- and 11-fold in the CgCx, CPu and NAc, respectively. The effect was reduced by 74% in the NAc, but not in the other structures, when TsA was administered before cocaine.

Discussion

We report here that cocaine self-administration by rats was accompanied by an increased synthesis of Mecp2 and of several histone deacetylases in the CgCx, CPu and NAc. The study was conducted at the level of both mRNA and protein expression. It confirms a previous work in which we have already shown that i.p. injection of cocaine or fluoxetine for ten days increases Mecp2 protein synthesis in the CgCx and CPu (Cassel et al., 2006). Concerning the HDACs, we studied the expression of one member of each of class I, IIa and IV. HDAC2 isoform, a member of class I HDAC family, has also been found to be induced in the CPu in the above mentioned study. HDAC5 is a member of class IIa HDAC family that is

highly expressed throughout the brain (Broide et al., 2007). We found that cocaine self-administration decreased the nuclear localization of HDAC5 in the structures examined, suggesting a nuclear export of this protein in response to the drug. HDAC11 isoform is the only representative of class IV of HDACs and has not been characterized beyond genomic localization and its high expression in rat brain (Broide et al., 2007). Our data showing that cocaine self-administration increased the percentage of HDAC11 immunoreactive cells in the CgCx, CPu, NAc and NAcS suggest a role for this enzyme in the regulation of cocaine-induced neuroadaptations.

HDAC5 is known to associate with MEF2C transcription factor and to act as a potent inhibitor of MEF2-dependent transcription (McKinsey et al., 2000). Following phosphorylation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase, protein kinase D or salt-inducible kinase, HDAC5 binds a 14-3-3 protein and subsequently shuttles from the nucleus to the cytoplasm allowing MEF2C-dependent transcription to occur (McKinsey et al., 2000; Walkinshaw et al., 2008). On the other hand, at least two protein phosphatases (PP1 β and PP2A) have been shown to dephosphorylate HDAC5, therefore inducing nuclear import (Walkinshaw et al., 2008). Target genes of MEF2C include myogenic *bHLH* gene and the MEF2C gene itself (Wang et al., 2001). We therefore considered MEF2C synthesis as an index of MEF2C activation. Our data indicate that in the CgCx of rats self-administering cocaine, phospho-HDAC5 immunoreactivity decreased in the

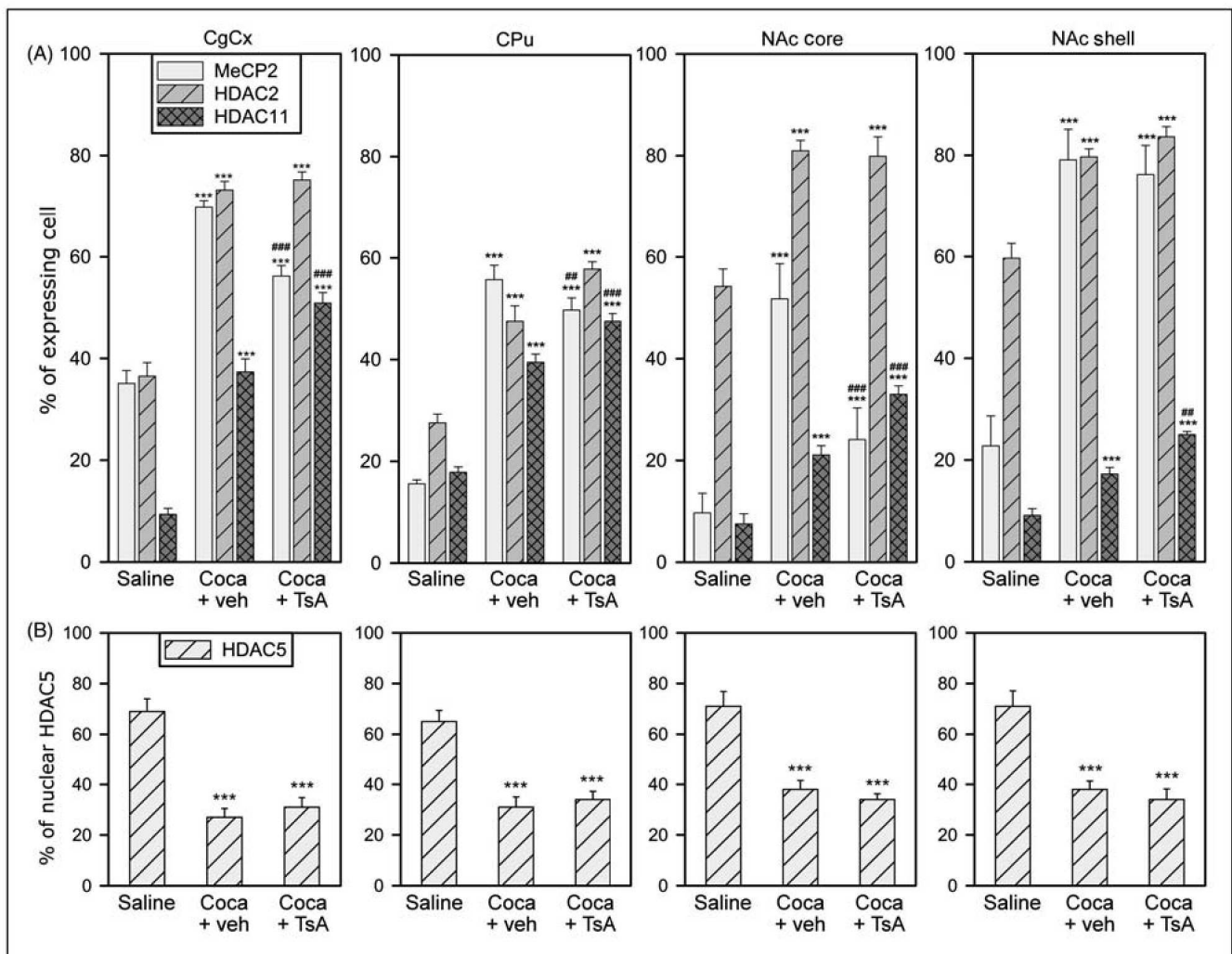


Figure 2. Expression of chromatin-remodelling proteins by cocaine. Quantification of MeCP2, HDAC2, HDAC5 and HDAC11 was carried out in anterior cingulate cortex (CgCx), caudate-putamen (CPu) and nucleus accumbens core (NAc) and shell (NAcS) from rats self-administering saline ('Saline'), rats self-administering cocaine ('Coca+veh') and rats treated with 0.3 mg/kg TsA ('Coca+TsA') before each self-administration session ($n=4$ per group). Treatment of rats and immunohistochemistry were carried out as described under Materials and methods. (A) For MeCP2, HDAC2 and HDAC11, the percentage of immunoreactive cells was calculated on two serial sections from four rats and expressed as means \pm SEM. (B) For HDAC5, results are expressed as percentage of immunoreactive nuclei. *** $p < 0.001$, comparison with control rats; ### $p < 0.01$, #### $p < 0.001$, comparison between vehicle-treated and TsA-treated groups (ANOVA followed by Student–Newman–Keuls post hoc test).

nucleus and accumulated in the cytoplasm of many cells. This factor was accompanied by an important increase in the number of MEF2C-immunoreactive cells. The observation is in agreement with a study showing that in the NAc, chronic i.p. cocaine injection increases the phosphorylation of HDAC5 and its subsequent nuclear export (Renthal et al., 2007). Our data also confirm that HDAC5 regulation by cocaine does not take place at the level of its transcription.

Among the genes we examined, treatment with the general HDAC inhibitor TsA before each cocaine self-administration session was found to mostly affect MeCP2 and HDAC11 expression. No effect was observed on HDAC2 expression or on HDAC5 expression and/or distribution. When considering the conventional view that histone hyper-acetylation is associated with increased gene expression, it was surprising to find that treatment with TsA actually decreased MeCP2

mRNA and protein levels in the structures examined. A similar effect was reported previously in lymphosarcoma cells treated with TsA (Ghoshal et al., 2002), while treatment of C6 cells with the sodium valproate HDAC inhibitor led to increased MeCP2 expression (Kim et al., 2008). Obviously, some process other than histone deacetylation participates in the regulation of MeCP2 transcription in rat brain. In contrast, HDAC11 expression was clearly increased in response to TsA treatment at both the mRNA and protein levels, indicating that its transcription is governed by a conventional epigenetic mechanism. It appears that the *HDAC11* gene is among the genes the expression of which is under the control of histone acetylation, a regulation processing that represents a feedback loop determining global histone acetylation level (Ajamian et al., 2004). Our data also show that treatment with TsA did not modify MEF2C transcription in the CgCx

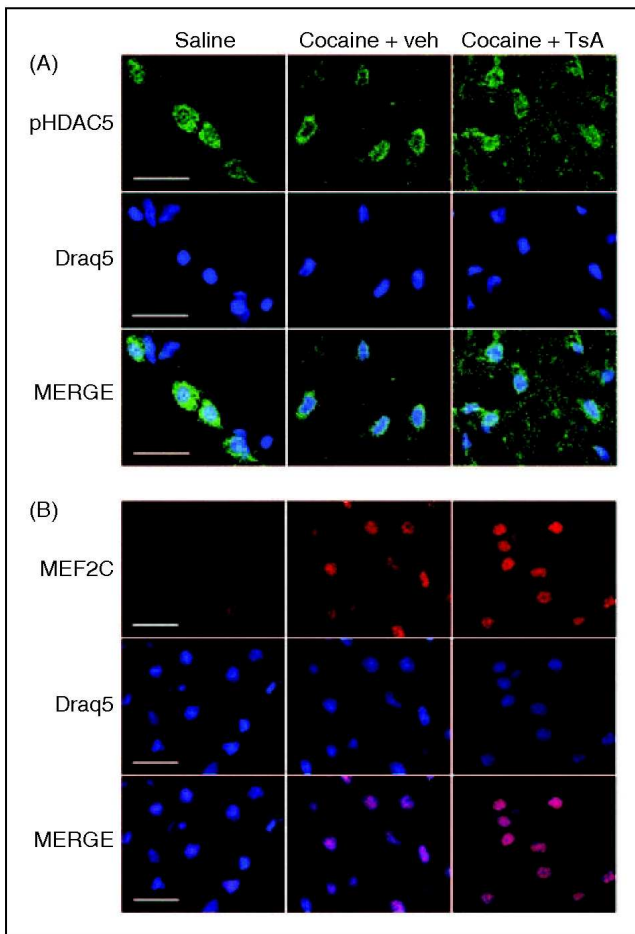


Figure 3. Phospho-HDAC5 (A) and MEF2C (B) expression in response to cocaine self-administration. Labelling for phospho-HDAC5 et MEF2C was carried out in CgCx from rats self-administering saline ('Saline'), self-administering cocaine ('Cocaine+veh') and rats treated with TsA ('Cocaine+TsA') before each self-administration session ($n = 4$ per group). Animals were sacrificed 2 h after the fourth self-administration session. Coronal tissue sections were incubated with polyclonal antibodies as described under Materials and methods. Secondary labeled antibodies against phospho-HDAC5 (Alexa Fluor 488, green) and MEF2C (CY3, red) were used. Nuclei were stained with DraQ5 (shown in blue). Scale bar, applicable to the three micrographs present in the same line, 20 μm .

and CPu, but decreased dramatically MEF2C mRNA synthesis in the NAc. The observation suggests that in the NAc, some factor sensitive to acetylation either prevents MEF2C activation or that MEF2C-dependent MEF2C transcription is under control of a mechanism that involves histone acetylation. The situation is even more complex if one considers that TsA not only modifies histone acetylation, but also causes hypo-methylation of certain gene promoters through the inhibition of DNA methyltransferase 3B expression (Xiong et al., 2005), a phenomenon that would result in increased transcription of the corresponding genes.

In a previous study, we showed that injection of HDAC inhibitors to rats had a profound effect on the motivation of the animals to self-administer cocaine (Romieu et al., 2008). The present data were obtained in brain structures of rats submitted to four daily sessions of cocaine self-administration.

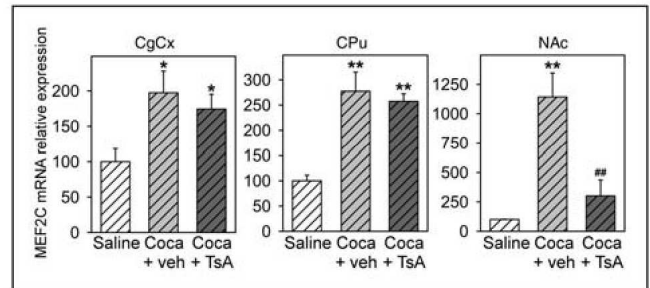


Figure 4. MEF2C mRNA expression in response to cocaine self-administration. MEF2C mRNA expression was measured by real-time quantitative PCR analysis in anterior cingulate cortex (CgCx), caudate-putamen (CPu) and nucleus accumbens (NAc). Values are means \pm SEM of mRNA expressed in the indicated brain structures of rats self-administering saline ('Saline'), self-administering cocaine ('Coca+veh') and rats treated with TsA ('Coca+TsA') before each cocaine self-administration session ($n = 4$ per group). Data represent the amount of each transcript, which was normalized to that of 36B4 mRNA in each sample. Values are expressed as percentage of mRNA content in saline treated animals. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, comparison with control rats; ## $p < 0.01$, comparison between vehicle-treated and TsA-treated groups (ANOVA followed by Student-Newman-Keuls post hoc test).

They show that modification of the behaviour was accompanied by extensive changes in the expression of genes encoding epigenetic regulation elements. Interestingly, while the expression of *Mecp2*, MEF2C and of all the *HDAC* genes considered in the present study was greatly affected in rats submitted to the operant behavioural test, we noticed that only a few of these genes were differentially expressed when the rats were treated with the HDAC inhibitor TsA before each session. A correlation can therefore be drawn between the modification of gene expression and the reinforcing property of cocaine, which is very high after four sessions of self-administration and which was found to be reduced by TsA. This situation is the case for *Mecp2*, the synthesis of which was largely induced by cocaine and for which a decrease in mRNA and protein levels was found in response to TsA in the CgCx, a structure entailed in anticipation of tasks and in modulation of emotional responses and in the NAc, a key structure for motivation and reward processing. This also appears in the NAc for MEF2C mRNA expression, which was induced by cocaine and subsequently reduced by TsA. The two factors known to regulate gene transcription appear as candidates for playing an important role in the neurobiological mechanism dictating a decrease in the reinforcing properties and in the lesser motivation of the rats for taking cocaine. The genes that are regulated by these factors remain however to be characterized.

Acknowledgements

We thank Arielle Ferrandon and Sylvie Dirrig-Grosch for help with immunohistological techniques. The research was supported by funds from INSERM. All authors declare that they have no conflicts of interest. They declare that no financial support or compensation has been received from any individual or corporate entity for research or professional service, except for income received from their primary employers.

References

- Ajamian F, Salminen A, Reeben M (2004) Selective regulation of class I and class II histone deacetylases expression by inhibitors of histone deacetylases in cultured mouse neural cells. *Neurosci Lett* 365: 64–68.
- Berger SL (2002) Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev* 12: 142–148.
- 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.
- Caine SB, Lintz R, Koob GF (1993) Intravenous drug self-administration techniques in animals. In: Sahgal A (ed.) *Behavioural neuroscience: a practical approach*. Oxford: Oxford University Press, 117–143.
- Cassel S, Revel MO, Kelche C, Zwiller J (2004) Expression of the methyl-CpG-binding protein MeCP2 in rat brain. An ontogenetic study. *Neurobiol Dis* 15: 206–211.
- Cassel S, Carouge D, Gensburger C, et al. (2006) Fluoxetine and cocaine induce the epigenetic factors MeCP2 and MBD1 in adult rat brain. *Mol Pharmacol* 70: 487–492.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156–159.
- de Ruijter AJ, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg AB (2003) Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* 370: 737–749.
- Di Chiara G, Imperato A (1988) Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 5274–5278.
- Gao L, Cueto MA, Asselbergs F, Atadja P (2002) Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *J Biol Chem* 277: 25748–25755.
- Ghoshal K, Datta J, Majumder S, et al. (2002) Inhibitors of histone deacetylase and DNA methyltransferase synergistically activate the methylated metallothionein I promoter by activating the transcription factor MTF-1 and forming an open chromatin structure. *Mol Cell Biol* 22: 8302–8319.
- Haberland M, Montgomery RL, Olson EN (2009) The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat Rev Genet* 10: 32–42.
- Herman D, Jansen K, Burnett R, Soragni E, Perlman SL, Gottesfeld JM (2006) Histone deacetylase inhibitors reverse gene silencing in Friedreich's ataxia. *Nat Chem Biol* 2: 551–558.
- Hockley E, Richon VM, Woodman B, et al. (2003) Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, ameliorates motor deficits in a mouse model of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 2041–2046.
- Hubbert C, Guardiola A, Shao R, et al. (2002) HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* 417: 455–458.
- Jenuwein T, Allis CD (2001) Translating the histone code. *Science* 293: 1074–1080.
- Kim B, Rincon Castro LM, Jawed S, Niles LP (2008) Clinically relevant concentrations of valproic acid modulate melatonin MT(1) receptor, HDAC and MeCP2 mRNA expression in C6 glioma cells. *Eur J Pharmacol* 589: 45–48.
- Kouzarides T (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* 128: 693–705.
- 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.
- Levine AA, Guan Z, Barco A, Xu S, Kandel ER, Schwartz JH (2005) CREB-binding protein controls response to cocaine by acetylating histones at the fosB promoter in the mouse striatum. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 19186–19191.
- Lopez-Rodas G, Brosch G, Georgieva EI, Sendra R, Franco L, Loidl P (1993) Histone deacetylase. A key enzyme for the binding of regulatory proteins to chromatin. *FEBS Lett* 317: 175–180.
- Marushige K (1976) Activation of chromatin by acetylation of histone side chains. *Proc Natl Acad Sci USA* 73: 3937–3941.
- McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN (2000) Activation of the myocyte enhancer factor-2 transcription factor by calcium/calmodulin-dependent protein kinase-stimulated binding of 14–3-3 to histone deacetylase 5. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 14400–14405.
- Nan X, Ng HH, Johnson CA, et al. (1998) Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393: 386–389.
- Nestler EJ (2001) Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat Rev Neurosci* 2: 119–128.
- Renthal W, Maze I, Krishnan V, et al. (2007) Histone deacetylase 5 epigenetically controls behavioral adaptations to chronic emotional stimuli. *Neuron* 56: 517–529.
- Roberts DCS, Corcoran ME, Fobiger HC (1977) On the role of ascending catecholaminergic systems in intravenous self-administration of cocaine. *Pharmacol Biochem Behav* 6: 615–620.
- 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.
- Roth SY, Denu JM, Allis CD (2001) Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* 70: 81–120.
- Schroeder FA, Lin CL, Crusio WE, Akbarian S (2007) Antidepressant-like effects of the histone deacetylase inhibitor, sodium butyrate, in the mouse. *Biol Psychiatry* 62: 55–64.
- Verdin E, Dequiedt F, Kasler HG (2003) Class II histone deacetylases: versatile regulators. *Trends Genet* 19: 286–293.
- Walkinshaw DR, Tahmasebi S, Bertos NR, Yang XJ (2008) Histone deacetylases as transducers and targets of nuclear signaling. *J Cell Biochem* 104: 1541–1552.
- Wang DZ, Valdez MR, McAnally J, Richardson J, Olson EN (2001) The *Mef2c* gene is a direct transcriptional target of myogenic bHLH and MEF2 proteins during skeletal muscle development. *Development* 128: 4623–4633.
- White FJ, Kalivas PW (1998) Neuroadaptations involved in amphetamine and cocaine addiction. *Drug Alcohol Depend* 51: 141–153.
- Xiong Y, Dowdy SC, Podratz KC, et al. (2005) Histone deacetylase inhibitors decrease DNA methyltransferase-3B messenger RNA stability and down-regulate de novo DNA methyltransferase activity in human endometrial cells. *Cancer Res* 65: 2684–2689.
- Yang XJ, Seto E (2008) The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 206–218.

4.1. Résultats complémentaires

4.1.1. Le FR1

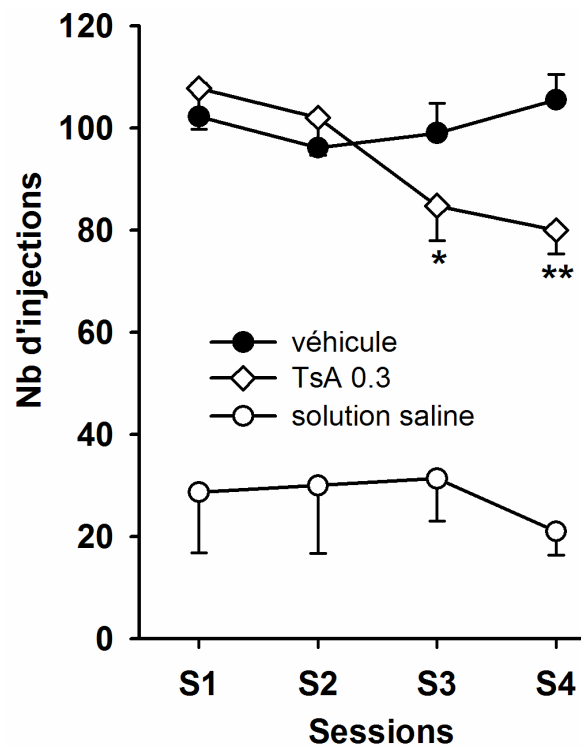


Figure C1. Effet de la TsA sur l'auto-administration de cocaïne (0,33mg/kg/injection) en FR1. La TsA (0,3mg/kg) ou la solution véhicule (DMSO 10%) a été injectée i.v. 30 min avant chacune des sessions d'AA en FR1. Le groupe « solution saline » fait référence à des rats, qui en réponse à leur nose-poke dans l'orifice actif reçoivent l'injection i.v. d'une solution saline et non pas de cocaïne. Le nombre d'injections effectuées durant les sessions journalières de 2 h est exprimé en tant que moyenne \pm erreur-type ($n = 4$ par groupe). * $p \leq 0,05$ et ** $p \leq 0,01$ en comparaison avec le nombre d'injections effectuées par le groupe « véhicule » pendant la même session. (ANOVA suivie d'un test de comparaison multiple de Student-Newman-Keuls).

5. Publication n°5

Inhibition of Histone Deacetylases in Rats Self-Administering Cocaine Regulates Lis1 and Reelin Gene Expression, as Revealed by Microarray Technique

Lionel Host, Patrick Anglard, Pascal Romieu, Christelle Thibault,

Doulaye Dembele, Dominique Aunis, Jean Zwiller

Journal of Neurochemistry, 2010

Après avoir démontré que l'AA de cocaïne stimulait l'expression du facteur de transcription MEF2C, ainsi que l'expression d'autres facteurs connus pour réguler la transcription, tels MeCP2 ou HDAC11, nous avons cherché à caractériser l'ensemble des gènes dont l'expression était modifiée par la TsA chez des rats s'auto-administrant la cocaïne en FR1. Nous avons utilisé la technologie des microarrays pour déterminer le pattern d'expression de gènes dans le CgCx et dans le NAc.

Dans cette expérience, nous avons identifié 722 et 136 échantillons, respectivement dans le CgCx et dans le NAc, différentiellement exprimés, entre des rats traités ou non par la TsA. Ces résultats ont été confirmés concernant sept gènes, au moyen de la technique de RT-qPCR. Nous nous sommes alors focalisés sur les gènes *Lis1* (Lissencephaly gene-1) et *Reeline*, car :

- i) ils sont régulés de la même manière par l'AA de cocaïne et par la TsA.
- ii) ils appartiennent à la même cascade de signalisation cellulaire
- iii) des mutations au sein des deux gènes sont à l'origine d'une lissencéphalie, une malformation du cerveau humain caractérisée par la désorganisation des couches corticales résultant d'un défaut de migration neuronale.

Nous avons montré que l'AA de cocaïne induisait l'expression de ces deux gènes, que la TsA potentialisait cette induction dans le CgCx, mais qu'elle la bloquait dans les deux sous structures du NAc, à savoir la partie core et la partie shell. Nous avons aussi montré que l'administration i.p. de cocaïne pendant dix jours induisait la protéine Lis1 dans le CgCx et le Nac, ainsi que la protéine Reeline dans le NAc. Puisque l'injection répétée de fluoxétine, un inhibiteur spécifique de la recapture de la sérotonine, induit une expression similaire de Lis1, la composante sérotoninergique de la cocaïne participe sans doute à l'expression de cette protéine.

Inhibition of histone deacetylases in rats self-administering cocaine regulates lissencephaly gene-1 and reelin gene expression, as revealed by microarray technique

Lionel Host,^{*†} Patrick Anglard,^{*†} Pascal Romieu,^{*†} Christelle Thibault,^{†‡} Doulaye Dembele,^{†‡} Dominicus Aunis^{*†} and Jean Zwiller^{*†}

^{*}Inserm, U575, Centre de Neurochimie, Strasbourg, France

[†]Université de Strasbourg, Strasbourg, France

[‡]IGBMC, Microarray platform, Illkirch, France

Abstract

Injection of the histone deacetylase inhibitor trichostatin A (TsA) to rats has been shown to decrease their motivation to self-administer cocaine. In the present study, we investigated alterations in gene expression patterns in the anterior cingulate cortex and nucleus accumbens of rats self-administering cocaine and treated with TsA. Using oligonucleotide microarrays, we identified 722 probe sets in the cortex and 136 probe sets in the nucleus accumbens that were differentially expressed between vehicle and TsA-treated rats that self-administered cocaine. Microarray data were validated by real-time PCR for seven genes. Using immunohistochemistry, we further investigated the expression of *Lis1* and *reelin* genes,

because (i) they were similarly regulated by TsA at the mRNA level; (ii) they belong to the same signal transduction pathway; (iii) mutations within both genes cause lissencephaly. Cocaine self-injection was sufficient to activate the two genes at both the mRNA and protein levels. TsA treatment was found to up-regulate both *Lis1* and *reelin* protein expression in the cortex and to down-regulate it in the nucleus accumbens of rats self-administering cocaine. The data suggest that the two proteins contribute to establish neurobiological mechanisms underlying brain plasticity whereby TsA lowers the motivation for cocaine.

Keywords: cocaine self-administration, histone deacetylase, lissencephaly gene-1, microarray, reelin, trichostatin A. *J. Neurochem.* (2010) **113**, 236–247.

Cocaine is an addictive stimulant drug abused by humans and self-administered by rats (Roberts and Koob 1982). The psychostimulant interferes with monoamine transporters, resulting in increased synaptic levels of the amines (Ritz *et al.* 1987). The dopaminergic system that originates from the ventral tegmental area and projects to the nucleus accumbens (NAc) and to other forebrain structures like the anterior cingulate cortex (CgCx) is thought to represent a key pathway by which psychostimulants produce reinforcement (Di Chiara and Imperato 1988). The NAc, which is typically divided into two major subdivisions, the shell and the core, has been implicated in self-administration of psychostimulants (Koob 1992) and in the expression of cocaine-induced sensitization, a phenomenon that may mimic aspects of the development of addiction (Robinson and Berridge 2001). The CgCx appears to be implicated in compulsive drug-taking, in craving and relapse after withdrawal and in the development and maintenance of behavioral sensitization (Childress *et al.* 1999; Goldstein and Volkow 2002).

Dysfunction of the frontal cortex may result in greater impulsivity and impaired decision-making, which are often observed in chronic cocaine users (Bolla *et al.* 2003).

Drug dependence is currently viewed as a chronic brain disease characterized primarily by a compulsive drug-seeking and drug-taking behavior. It occurs over time and requires persistent cellular adaptations (White and Kalivas 1998; Nestler 2001). One area of intensive research therefore

Received December 4, 2009; revised manuscript received January 6, 2010; accepted January 8, 2010.

Address correspondence and reprint requests to Jean Zwiller, Unite Inserm U575, Centre de Neurochimie, 5 rue Blaise Pascal, 67084 Strasbourg Cedex, France. E-mail: zwiller@neurochem.u-strasbg.fr

Abbreviations used: CgCx, anterior cingulate cortex; CPu, caudate-putamen; *FMRI*, fragile X mental retardation gene-1; FR1, fixed-ratio 1; HDAC(s), histone deacetylase(s); i.p., intraperitoneal; i.v., intravenous; *Lis1*, lissencephaly gene-1; NAc(S/C), nucleus accumbens (shell/core); PBS, phosphate-buffered saline; TsA, trichostatin A; TSC22, transforming growth factor- β stimulated clone-22.

aims at identifying the long-term adaptations induced by cocaine. It was recently reported that regulation of gene expression in the mature brain by cocaine includes epigenetic mechanisms that regulate the accessibility of genes to the transcriptional machinery (Colvis *et al.* 2005; Cassel *et al.* 2006). In the nucleosome, access to DNA is achieved via complex associations of proteins in which post-translational modifications of histones play a major role. Histone acetylation on lysine residues in the amino-terminal tail is the most frequent post-translational histone modification. In general, increased histone acetylation is associated with DNA relaxation and elevated transcriptional activity, whereas decreased acetylation brought about by histone deacetylases (HDACs) results in tighter DNA coiling and gene silencing (Jenuwein and Allis 2001; de Ruijter *et al.* 2003).

In a recent report, we have shown that repeated injections of the HDAC inhibitor trichostatin A (TsA) to rats were sufficient to decrease their motivation to self-administer cocaine (Romieu *et al.* 2008). The aim of the present study was to investigate alterations in gene expression patterns in the NAc and CgCx of rats self-administering cocaine and treated repeatedly with TsA, and to compare these alterations with those observed in rats taking only cocaine. We have used oligonucleotide microarrays to produce a large set of genes under the control of HDAC inhibition, and confirmed results of seven of them by real-time PCR. Two of them were further characterized by immunohistochemistry, which allowed to compare the effect of self-administered cocaine to the effect of non-contingent cocaine administration, as well as to the effect of a serotonin-elevating drug.

Materials and methods

Animals

Male Wistar rats (Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France), weighing 160–180 g, were housed in standard home cages (5 rats per cage), under an inverted 12 h light–dark cycle (lights on at 7:00 PM). Animals had free access to food and water. After surgery for catheter implantation into the jugular vein, animals were housed individually so that acoustic, olfactory and visual social contacts remained possible. They were allowed to recover for 5–7 days before the beginning of the drug self-administration test, which was conducted during the dark period. All procedures involving animal care were conducted in compliance with national laws and policies (Council directive 87848, 1987, *Service Vétérinaire de la Santé et de la Protection Animale*; permission 67-165 to JZ) and with international guidelines (NIH publication 5586-23, 1985).

Pharmacological treatment

Cocaine hydrochloride (Cooper, Melun, France) solution was adjusted with NaCl 0.9% to infuse an intravenous (i.v.) dose of 0.33 mg/kg/injection for self-administration. Trichostatin A at 0.3 mg/kg (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) or 10% dimethylsulfoxide vehicle solution were administered i.v. 30 min before

the beginning of each self-administration session. For non-contingent drug administration, rats were intraperitoneally (i.p.) injected either acutely or repeatedly for 10 days (one injection per day) with 20 mg/kg cocaine hydrochloride or 10 mg/kg fluoxetine hydrochloride (Lilly, Indianapolis, IN, USA).

Surgical procedures

Intravenous catheterization procedure was performed as described (Caine *et al.* 1993). Rats were anesthetized with ketamine and xylazine prior to surgical implantation of a chronic indwelling catheter in the right jugular vein. The silicone catheter (Silastic[®]; Plastics One, Roanoke, VA, USA), was fitted to a 22 gauge guide cannula that was bent at a right angle and then embedded in dental cement on a circular 2.5 cm mercylene mesh base. A discrete incision was performed onto the jugular vein; the heparinized catheter was immediately inserted 3.6 cm into the vein and anchored with suture. Catheters were flushed daily with 150 μ L of a solution mixture containing 300 U/mL heparin and 0.1 g/mL ampicillin to prevent clotting and infection.

Cocaine operant self-administration

Drug self-administration was performed as previously described (Romieu *et al.* 2008) in dark operant chambers (30 \times 30 \times 30 cm) located in a sound-attenuated room. Briefly, a computer-driven syringe pump (Imetronic, Pessac, France) activated a 5 mL syringe and pushed fluid into silastic tubing connected to the rat through its externalized 22 gauge guide cannula. Each chamber was equipped with two 3 cm diameter holes on the same wall, located 4 cm above the floor; one was selected as the active hole for delivering the reinforcer and the other as the inactive hole. Disruption of an infrared photobeam in each hole (nose-poke) was detected using a digital input card (DIO-24; National Instrument, Austin, TX, USA) and home made LabView software (National Instrument). Nose-pokes into both holes were recorded. Nose-pokes into the inactive hole had no programmed consequence.

The procedure used was a fixed-ratio 1 (FR1) schedule of reinforcement that was carried out for 4 days during daily 2 h sessions (LeSage *et al.* 1999). In this schedule, each nose-poke into the active hole triggered the i.v. delivery of a 40 μ L cocaine solution over 2 s under the control of the computer. A stimulus light, located 20 cm above the active hole was paired contingently with the delivery of cocaine and persisted during a 40 s time-out period. No cut-off was applied concerning the number of self-infusions the rat was able to perform during the session.

Results are expressed as mean \pm SEM. Effect of TsA during the totality of the FR sessions was analyzed by two-way ANOVA (treatment and session as factors of variation) between groups of rats. Student–Newman–Keuls *post hoc* test was performed and significance was set at $p \leq 0.05$.

Oligonucleotide microarrays

Rats were killed 2 h after the fourth self-administration session by an overdose of pentobarbital (100 mg/kg, i.p.), their brains were removed and CgCx and NAc were dissected. Total RNA was extracted, according to the procedure described (Chomczynski and Sacchi 1987). Quality and quantity of the RNA were evaluated by measuring optical density at 260 and 280 nm, and by gel electrophoresis. RNA was converted to cDNA and transcribed into

cRNA in the presence of biotinylated ribonucleotides, according to standard Affymetrix protocols (Affymetrix 'Expression Analysis Technical Manual', #701021 Rev. 5). For each of the two treatment groups (cocaine + vehicle and cocaine + TsA), six rats were used. Brain tissue from two rats was pooled for hybridization. In total, 12 arrays were used, considering that we analyzed two brain structures. Hybridization was carried out using Affymetrix GeneChip® Rat Genome 230 2.0 oligonucleotide arrays (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) displaying about 31 000 probe sets. Microarrays were scanned using the Affymetrix GeneChip® Scanner 3000 7G.

Bioinformatics analysis

The selection of genes differentially expressed was based on data processed using the Affymetrix GeneChip operating software (GCOS v1.4; MAS 5.0 algorithm). An absolute analysis and a comparative analysis were performed (see Affymetrix technical note: statistical algorithms reference guide). In the absolute analysis, a detection algorithm was used to associate a *p*-value and a present call (P, present or A, absent) to each probe set on the array; the signal algorithm was used to associate expression levels to probe sets. In the comparative analysis, two algorithms were used. One associated a change call to probe sets: increase or marginal increase (I/MI), decrease or marginal decrease (D/MD) or non-change. The second algorithm computed a *p*-value for the signal log ratio associated to the change. The Wilcoxon's signed rank test was used to analyze the *p*-values obtained in the absolute and the comparative analyses.

The MAS 5.0 algorithm has been shown to be more sensitive and selective for identifying differentially expressed genes than Robust Multi-array Analysis (Irizarry *et al.* 2003; Millenaar *et al.* 2006; Pepper *et al.* 2007), especially when detection calls are used. We therefore selected differentially expressed genes by using the following steps: (i) selection of probes called present for the three baseline or treated tissue samples; (ii) selection of probes displaying

at least 2 I/MI (or 2 D/MD) detection calls; and (iii) selection of probes with comparison signal log ratios greater than 0.58 (or less than -0.58). We also verified that the selected probes possessed acceptable False Discovery Rate (Benjamini *et al.* 2001), using the *p*-values associated to the comparative analysis of GCOS algorithm.

Real-time qPCR analysis

For real-time qPCR analysis, groups of animals distinct from those used for microarray analysis were used. Three different groups of rats were considered: cocaine self-administering animals treated with vehicle or TsA 30 min before the self-administration session and an additional control group that received i.v. saline instead of cocaine in response to nose-pokes completed into the active hole. As indicated above, rats were killed 2 h after the fourth daily self-administration session by an overdose of pentobarbital; brains were removed and total RNA was extracted from CgCx, caudate-putamen (CPu) and NAc. First strand cDNA was generated from 1 µg of total RNA and random primers using Omniscript Reverse Transcriptase (Qiagen, Valencia, CA, USA) in a total volume of 20 µL in a 1 h reaction at 37°C. The reaction product was used for real-time qPCR assay with a Light Cycler instrument and technology (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) with SyBR Green I dye for detection. Sequences of forward and reverse primers used at 0.2 µM concentrations for measuring the expression of seven genes are indicated in Table 1. Amplicons have been designed to span exon borders to exclude false-positive detection of genomic contamination. PCR comprised an initial denaturation step of 10 min at 95°C, followed by 45 cycles; one cycle consisted of 10 s at 95°C, 5 s at the indicated hybridization temperature (Table 1) and for the indicated elongation time at 72°C. Quantification of results was achieved using the Standard Curve Method in which a standard curve is first constructed from cDNA of known concentration. This curve is then used as a reference standard for extrapolating

Table 1 Sequence and characteristics of primers used

Gene	Anneal. temp. (°C)	Position on cDNA (exon no.)	Sequence (5' → 3')	Transcript size (base)/elong. time (s)
<i>5HT_{2A}</i>	60	612–630 (E2) 764–784 (E3)	F: CGCTCAACTCCAGAACCA R: GCCACAAAAGAGCCTATGAGA	173/10
<i>FMR1</i>	60	1476–1495 (E12) 1619–1639 (E13)	F: GGCAAATCCTCCATCAGTTC R: GCATCTTCATCAGTCCTTCGT	164/10
<i>GABA_Aβ2</i>	60	599–618 (E6) 773–792 (E7)	F: CGGGAGTGACAAAGATTGAG R: AAAGGAGACCCAGGAGAGGA	194/11
<i>LIS1</i>	61	982–1001 (E5) 1187–1206 (E7)	F: GCAAACCTCTTGCTTCTGT R: CCCATTCTCTGTGTCCTGTG	225/12
<i>PP4R2</i>	60	767–786 (E7) 929–950 (E8)	F: TTTCTTTGTGACCCCTTA R: CGTTCCTCAGATTCCACAGTAT	184/11
<i>Reelin</i>	61	9438–9457 (E57) 9549–9567 (E58)	F: GCAATCCATCCTTCCACCTC R: GCTTCAACCCACCACAA	130/9
<i>TSC22</i>	61	652–671 (E1) 784–803 (E2)	F: GAAGTGGAGTCTGGGGTTT R: AAGTAGAGGGCTGGGGATT	152/10
<i>36B4</i>	61	738–757 (E5) 924–943 (E6)	F: GTGCCTCACTCCATCATCA R: TCCGACTCTTCTTTGCTTC	206/12

F, forward direction; R, reverse direction.

quantitative information for mRNA targets of unknown concentrations. Variation introduced as a result of variable RNA inputs was corrected by normalization to the housekeeping *36B4* gene, encoding the acidic ribosomal phosphoprotein P0. The specificity of each real-time qPCR product was verified by melting curve analysis. Reverse transcription and real-time qPCR were performed in triplicate for each gene.

Immunohistochemistry

Additional groups of animals treated as described above for real-time qPCR analysis were used for immunohistochemistry. Two hours after the fourth self-administration session, rats were perfused transcardially with 50 mL saline followed by 1% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS; 0.1 M; pH 7.2; 250 mL). The brains were then kept overnight at 4°C in 15% sucrose, frozen in isopentane at -40°C, and stored at -80°C. Coronal tissue sections (15-µm thick) were prepared using a Frigocut-E 2800 Cryostat (Reichert Microscope, Depew, NY, USA).

Immunohistochemistry was carried out essentially as described previously (Cassel *et al.* 2004). After incubation in PBS containing 0.5% bovine serum albumin and 0.5% Triton X-100 for 30 min, rat brain sections were incubated overnight with the following polyclonal rabbit antibodies: anti-lissencephaly gene-1 (anti-Lis1) antibody diluted 1 : 100 in PBS (Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, CA, USA) and anti-reelin antibody diluted 1 : 200 (Abcam, Cambridge, UK). Sections were then rinsed in PBS and successively incubated with biotinylated horse anti-rabbit IgG for 1 h, with an avidin-biotin-peroxidase complex (Vectastain Elite ABC Kit Universal, Vector Lab., Burlingame, CA, USA) for 1 h, rinsed in PBS and reacted for 8 min with the chromagen 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride and H₂O₂. Sections were then incubated for 15 min in 2.5 µM bisbenzimidazole (Hoechst 33258; Sigma-Aldrich) solution to label nuclei and coverslipped with Mowiol. Staining was observed under a fluorescent Leitz DM RB binocular microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), with L-Plan 10× ocular and Fluotar 40× objective (Leica Microsystems). Two photomicrographs were taken for a same field with an Axiocam camera (Carl Zeiss, Jena, Germany): one allowing counting the total number of nuclei stained with Hoechst 33258 and the other to count the number of immunoreactive cells for a given antigen. The percentage of immunoreactive cells in the CgCx, NAc core (NAcC) and NAc shell (NAcS) was calculated from counts on at least 800 cells by an investigator blinded to the identity of the samples. For each value, 6–8 counts were performed on four sections from four distinct rats.

Results

Gene expression profiling in rats self-administering cocaine and treated with TsA

The first step of the study was to identify genes the expression of which was regulated by the HDAC inhibitor TsA in dopaminergic brain structures of rats self-administering cocaine. Figure 1 shows that TsA treatment of rats trained daily during 2 h sessions of cocaine self-administration under the FR1 schedule of reinforcement produced a reduction in their cocaine intake behavior. The decrease in the number of self-injections was statistically significant

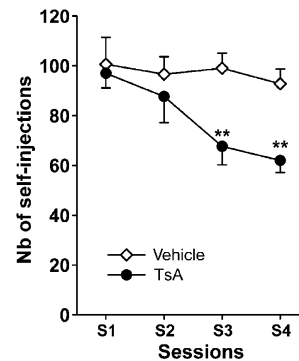


Fig. 1 Effect of trichostatin A (TsA) on cocaine self-administration (0.33 mg/kg/infusion) under the FR1 schedule of reinforcement. TsA or vehicle (10% dimethylsulfoxide) was administered i.v. 30 min before the beginning of each cocaine self-administration session. The number of self-injections reached during 2-h daily sessions is expressed as mean ± SEM. Vehicle-treated ($n = 6$) and 0.3 mg/kg TsA-treated ($n = 6$) groups of rats were studied. ** $p < 0.01$, two-way ANOVA (treatment and session as factors of variation) followed by Student–Newman–Keuls *post hoc* test.

from the third session ($F_{1,47} = 11.9$; $p < 0.001$). The rats which exhibited a 33% reduction in the number of self-injections in response to TsA during the fourth self-administration session (Fig. 1) were used for gene expression profiling in both the NAc and the CgCx. We compared TsA- and vehicle-treated groups in both structures using three separate Rat Genome 230 2.0 oligonucleotide arrays per group. The data discussed in this publication have been deposited in NCBI's gene expression omnibus and are accessible through GEO series accession number GSE18055 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE18055>).

In the CgCx, the selection criteria used for the microarray analysis led to 722 probe sets showing significant differential expression in TsA-treated rats compared with vehicle-treated rats (692 probe sets were up-regulated and 30 were down-regulated). Among the genes differentially expressed, one can find genes encoding neurotransmitter receptors, such as the GABA_A-β2 receptor subunit (2.3-fold change; $p = 0.007$) or the 5-HT_{2A} receptor (1.6-fold change; $p = 0.025$); cation channels, such as the voltage-dependent calcium channel β4 subunit (1.7-fold change; $p = 0.017$) or the long transient receptor potential channel TRPC7 (1.8-fold change; $p = 0.008$). The fragile X mental retardation gene *FMR1* (1.6-fold change; $p = 0.021$), the regulatory subunit 2 of protein phosphatase 4 (2.1-fold change; $p = 0.038$) and the *Lis1* gene (2.0-fold change; $p = 0.005$), which is implicated in the layering of the developing cerebral cortex, were also up-regulated by the TsA treatment.

In the NAc, 136 probe sets were differentially expressed between the two groups when considering probe sets selected by the statistical analysis. Among them, 25 probe sets were

up-regulated and 111 were down-regulated in the TsA-treated group as compared with the group that only self-administered cocaine. The list includes genes such as *reelin* (0.5-fold change; $p = 0.017$), encoding a protein which is essential for long-term memory formation or genes encoding transcription factors such as the transforming growth factor- β stimulated clone-22 (*TSC22*) domain family protein 4, a member of the leucine zipper protein family of transcription factors (2.6-fold change; $p = 0.009$).

Validation of gene expression by real-time qPCR

To confirm the results from oligonucleotide microarray experiments, we verified using real-time qPCR that some of the genes were indeed differentially expressed between the various groups. The experiment was carried out in groups of rats distinct from those used for gene profiling. Messenger RNA levels were measured in three groups of rats: (i) one control group that received i.v. saline instead of cocaine in response to nose-pokes achieved into the active hole. These rats completed only 19% of the total injections achieved by the cocaine taking animals. Only 36% of the nose-pokes were directed toward the active hole, compared with 89% in the cocaine group; (ii) one group self-administering cocaine for four daily sessions and injected with vehicle and (iii) one group treated with TsA before each self-administration session. Statistical analysis concluded that the differences between groups were also significant ($F_{2,47} = 79.3$; $p < 0.001$).

Table 2 shows mRNA expression in the CgCx, CPu and NAc of seven genes that were found to be differentially expressed in the microarray experiment: five up-regulated genes in the CgCx, followed by one up-regulated and one down-regulated gene in the NAc. All the genes that were up-regulated by TsA in the cortex in the microarray experiment were also found to be induced to a large extent when assayed by real-time qPCR. Agreement of the quantification values between the two techniques was satisfactory. For instance, the amount of *Lis1* transcripts measured by real-time qPCR was enhanced 2.8-fold by the TsA treatment in the CgCx, whereas a 2.0-fold change was noted in the microarray experiment. This increase was not observed in the CPu. In the NAc, treatment with TsA nearly abolished the expression of *Lis1* (90% decrease compared with saline). On the opposite, TsA was found to increase the expression of *5-HT_{2A} receptor* and *FMRI* genes in the NAc. It is noteworthy that some genes, characterized as regulated by TsA, were already induced in response to cocaine. This is especially the case for *Lis1* and *FMRI* genes, which were induced in the CgCx approximately ten- and threefold, respectively, in the cocaine self-administration group over the control group.

The *reelin* gene that was down-regulated by TsA in the NAc in the microarray experiment was also reduced in the same structure when assayed by real-time qPCR, but induced in the CPu (Table 2). On the opposite, the *TSC22* gene that

Table 2 Messenger RNA expression of *Lis1*, *GABA_A β 2*, *5HT_{2A}*, *FMRI*, *PP4 regulatory subunit 2*, *TSC22* and *Reelin* measured by real-time qPCR analysis

	Saline	Cocaine + veh	Cocaine + TsA
<i>LIS1</i>			
CgCx	100 \pm 20	950 \pm 150*	2691 \pm 244***,##
CPu	100 \pm 38	296 \pm 51*	125 \pm 36##
NAc	100 \pm 23	178 \pm 17*	8 \pm 2*,###
<i>GABA_Aβ2</i>			
CgCx	100 \pm 20	98 \pm 23	320 \pm 65*,#
CPu	100 \pm 20	212 \pm 24	285 \pm 54*
NAc	100 \pm 29	215 \pm 31	160 \pm 37
<i>5HT_{2A}</i>			
CgCx	100 \pm 26	143 \pm 28	497 \pm 52*,##
CPu	100 \pm 20	190 \pm 24*	265 \pm 23***,#
NAc	100 \pm 16	160 \pm 19	254 \pm 19***,##
<i>FMRI</i>			
CgCx	100 \pm 30	311 \pm 62*	1118 \pm 153***,#
CPu	100 \pm 27	364 \pm 54*	448 \pm 68*
NAc	100 \pm 34	292 \pm 43*	472 \pm 68#
<i>PP4R2</i>			
CgCx	100 \pm 33	142 \pm 31	501 \pm 74***,##
CPu	100 \pm 15	295 \pm 39**	325 \pm 47**
NAc	100 \pm 22	272 \pm 28**	329 \pm 23**
<i>TSC22</i>			
CgCx	100 \pm 15	142 \pm 35	263 \pm 59*,#
CPu	100 \pm 25	143 \pm 43	200 \pm 38
NAc	100 \pm 13	226 \pm 29**	234 \pm 29**
<i>Reelin</i>			
CgCx	100 \pm 35	115 \pm 42	155 \pm 39
CPu	100 \pm 13	158 \pm 36	299 \pm 46*,#
NAc	100 \pm 23	373 \pm 26*	271 \pm 27#

Values are mean \pm SEM of mRNA levels, expressed as percentages of those found in saline treated animals, in anterior cingulate cortex (CgCx), caudate-putamen (CPu) and nucleus accumbens (NAc) from rats self-administering cocaine (Cocaine + veh) and rats treated with TsA before each self-administration session (Cocaine + TsA) ($n = 4$ per group). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, comparison with saline group; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, comparison between vehicle-treated and TsA-treated groups (ANOVA followed by Student–Newman–Keuls *post hoc* test).

was found to be induced in the NAc in the microarray experiment was not increased by real-time qPCR in this structure, but it was induced in the cortex.

Validation of Lis1 protein expression

In the CgCx, *Lis1* was clearly the gene that was subjected to inductions of highest amplitudes in response to cocaine; it was also induced to a large extent when TsA was given to animals self-administering cocaine. We therefore verified that *Lis1* expression was induced at the protein level, using immunohistochemistry. Figure 2 illustrates *Lis1* protein expression in the CgCx and in the core and shell compart-

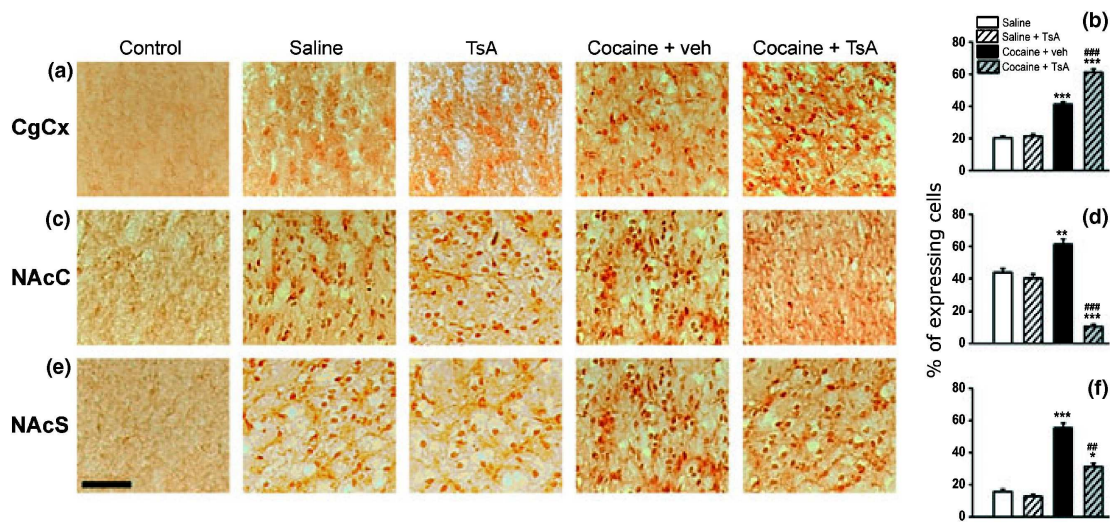


Fig. 2 Immunohistochemistry of lissencephaly gene-1 (Lis1) in anterior cingulate cortex (CgCx) and nucleus accumbens (NAc). Photomicrographs showing Lis1 immunoreactivity in CgCx (a), NAc core (NAcC) (c) and NAc shell (NAcS) (e) of saline-treated rats ($n = 4$), rats treated with trichostatin A (TsA) ($n = 4$), rats self-administering cocaine ($n = 4$) and rats treated with 0.3 mg/kg TsA before the self-administration sessions ($n = 4$). 'Control' shows experiments in which the primary antibody was omitted. Quantification of Lis1 immuno-

reactivity is shown for CgCx (b), NAcC (d) and NAcS (f) in the same groups of animals. Each bar represents the percentage of immunoreactive cells calculated from 6 to 8 counts on four sections from four rats, expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, comparison with saline control rats; ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, comparison between vehicle-treated and TsA-treated groups (ANOVA followed by Student–Newman–Keuls *post hoc* test). Scale bar applicable to all micrographs, 50 μ m.

ments of the NAc in separate groups of rats, that showed also significant behavioral differences ($F_{3,63} = 66.8$; $p < 0.001$). An additional control group of animals treated with TsA and receiving saline in response to nose-pokes was also introduced at this point. In the CgCx, the number of Lis1 immunoreactive cells increased in rats that self-administered cocaine for four daily sessions; the number was further increased in rats treated with TsA before each session (Fig. 2a). The quantitative analysis of Fig. 2(b) confirms that only about 20% of cells showed Lis1 immunoreactivity in control rats, whether or not treated with TsA; the percentage of Lis1 immunoreactive cells significantly increased to 41% in response to cocaine self-administration (2.1-fold increase) and to 61% when the rats were treated with TsA before the sessions (3.0-fold increase), implying that HDAC inhibition enhanced Lis1 expression 1.5-fold. As observed for the induction of *Lis1* mRNA, the increase in Lis1 protein was in agreement with that obtained in the microarray study (2.0-fold).

Lis1 was expressed at high levels in the core part of the NAc of control saline- or TsA-treated rats (Fig. 2c). A slight increase in the number of Lis1-positive cells could be observed after 4 days of cocaine intake, but the number decreased dramatically upon TsA treatment before the self-administration sessions. The quantitative analysis of Fig. 2(d) shows that the percentage of immunoreactive cells in the NAcC rose from 44% in control rats to 61% in response to cocaine self-administration. Surprisingly, only

11% of cells displayed immunoreactivity after TsA treatment, which corresponded to a value lower than the control value. In contrast to what we observed in the core, the shell subregion of the NAc displayed only about 16% Lis1-positive cells in control rats (Fig. 2e and f). The number rose dramatically to 55% upon cocaine self-administration and fell in response to the HDAC inhibition by TsA to a level that was still above the control.

We next asked whether the Lis1 induction noticed upon cocaine self-administration was also observed after non-contingent administration of the drug of abuse. Figure 3 shows that a single i.p. injection of cocaine was increasing Lis1 protein expression by 2.3-, 1.3- and 1.8-fold in the CgCx, NAcC and NAcS, respectively. The repeated treatment with cocaine for 10 days led to stronger inductions (4.7-, 1.6- and 2.4-fold increase in CgCx, NAcC and NAcS, respectively). Surprisingly, repeated fluoxetine treatment was at least as efficient as cocaine in inducing Lis1 protein, because a 7.2-, 1.7- and 3.0-fold increase was noted in CgCx, NAcC and NAcS, respectively. Similar results to those found in the NAcS were obtained in the CPu (data not shown).

Validation of reelin protein expression

To further validate the results from microarray experiments in the NAc, we measured by immunohistochemistry the expression of the reelin protein, which was found to be down-regulated in this dopaminergic structure by TsA in the microarray experiment as well as by real-time qPCR.

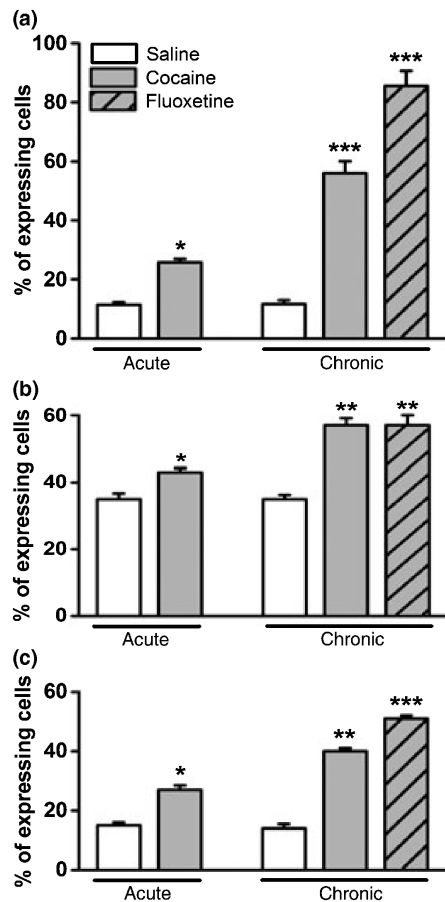


Fig. 3 Immunohistochemistry of lissencephaly gene-1 (Lis1) in cingulate cortex (CgCx) and nucleus accumbens (NAc). Quantification of Lis1 immunoreactivity in CgCx (a), NAc core (NAcC) (b) and NAc shell (NAcS) (c) of rats i.p. injected acutely with saline ($n = 4$) or 20 mg/kg cocaine ($n = 4$) or in rats i.p. injected for 10 days (1 injection per day) with saline ($n = 5$), cocaine ($n = 4$) or 10 mg/kg fluoxetine ($n = 4$). Each bar represents the percentage of immunoreactive cells calculated from seven counts on four sections, expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, comparison with saline control rats (ANOVA followed by Student–Newman–Keuls *post hoc* test).

Figure 4 illustrates reelin expression in the CgCx and NAc subregions in the same groups of rats as those used for the expression of Lis1. Reelin immunoreactivity was evident in the cytoplasm and also in the extracellular matrix, as reported earlier (Pesold *et al.* 1998). TsA alone had no effect on the expression, and the number of immunoreactive cells in the NAc subregions increased after 4 days of cocaine self-administration when compared with the control groups (Fig. 4a, c and e). This induction was highly potentiated in the cortex by TsA injection, but was reduced in the NAc. The quantitative analysis of Figure 4(b), (d) and (f) shows that around 20% of cells exhibited reelin immunoreactivity in control conditions. The percentage of reelin-positive cells

was significantly enhanced in the NAc of rats self-administering cocaine. Injection of TsA before each cocaine self-administration session resulted in an augmentation in reelin immunoreactivity in the cortex. In agreement with data obtained for the mRNA expression, reelin protein expression was found to be reduced by TsA in both NAc subregions. The decrease over the value found in the cocaine self-administering group was about 50% in the NAcC and NAcS.

As we did for Lis1, we measured the reelin protein expression after non-contingent cocaine administration. Figure 5 shows that no significant effect was produced by the various agents in the CgCx. A single i.p. injection of cocaine was slightly increasing reelin protein expression in the NAc core and shell. The repeated treatment with cocaine for 10 days increased the expression by 2.2- and 1.7-fold in the core and shell, respectively. Repeated fluoxetine injection had no effect on reelin protein expression. Similar results to those found in the NAc were obtained in the CPu (data not shown).

Discussion

Injection of the HDAC inhibitor TsA to rats during the initial phase of cocaine self-administration had a profound effect on their cocaine intake behavior. Our results are in line with a recent report showing that chronic injection into the NAc of another HDAC inhibitor, valproic acid, attenuated amphetamine-induced locomotor activity in rats (Kim *et al.* 2008). The results are also in accord with a recent report showing that administration of an HDAC inhibitor facilitates the extinction of cocaine-induced conditioned place preference and reduces the reactivation of place preference (Malvaez *et al.* 2009). In contrast to these and our findings, a previous study showed that treatment of rats with the low-affinity HDAC inhibitor sodium butyrate enhanced the locomotor-activating effects of cocaine and that TsA administration to mice potentiated cocaine-induced place conditioning (Kumar *et al.* 2005). There are several possible methodological explanations for the differences observed, such as circadian cycle (inverted in this study), length of drug administration, type of drug administration (passively administered for locomotor activity and conditioned place preference, whereas in this study cocaine was self-administered), as well as type of analysis (locomotor activity and appetitive properties of cocaine, whereas we measured the reinforcing properties of cocaine). More recently, TsA infusion into the NAc during the chronic phase of self-administration was found to increase the motivation for cocaine self-administration (Wang *et al.* 2009). But in that experiment, the role of histone acetylation was analyzed after several weeks of cocaine intake, whereas we injected TsA during the acquisition phase of self-administration. Increased motivation for cocaine was obtained when the inhibitor was infused into the NAc shell, but not core, while we administered it i.v. Another

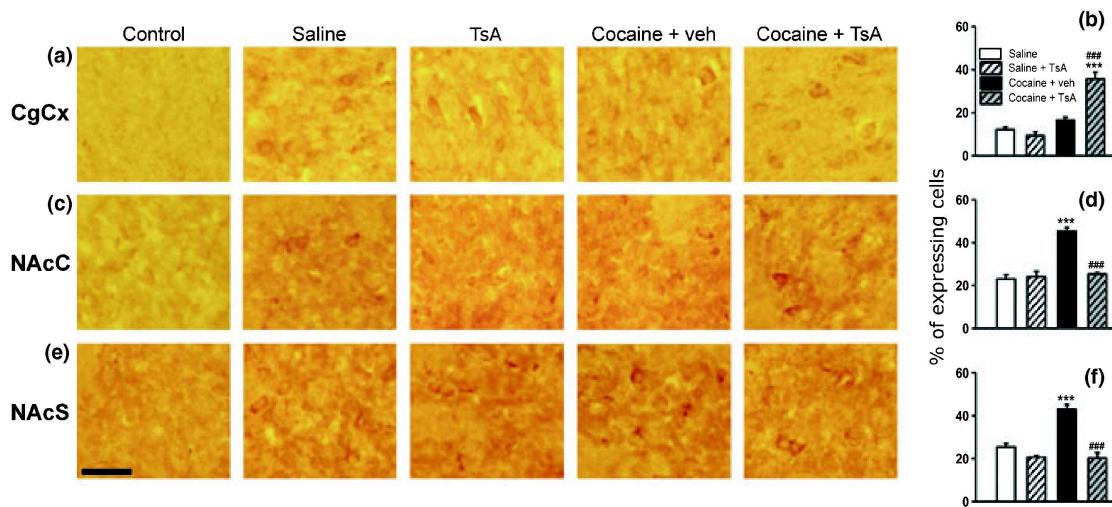


Fig. 4 Immunohistochemistry of reelin in cingulate cortex (CgCx) and nucleus accumbens (NAc). Photomicrographs showing reelin immunoreactivity in CgCx (a), NAc core (NAcC) (c) and NAc shell (NAcS) (e) of saline-treated rats ($n = 4$), rats treated with trichostatin A (TsA) ($n = 4$), rats self-administering cocaine ($n = 4$) and rats treated with 0.3 mg/kg TsA before the self-administration sessions ($n = 4$). 'Control' shows experiments in which the primary antibody was omitted. Quantification of immunoreactivity is shown for CgCx (b), NAcC (d)

and NAcS (f) in the same groups of animals. Each bar represents the percentage of immunoreactive cells calculated from seven counts on four sections from four rats, expressed as mean \pm SEM. *** $p < 0.001$, comparison with saline control rats; *** $p < 0.001$, comparison between vehicle-treated and TsA-treated groups (ANOVA followed by Student–Newman–Keuls *post hoc* test). Scale bar applicable to all micrographs, 25 μ m.

possibility is that several histone modifications can take place in concert at the same histone tail, corresponding to various states of remodeled chromatin and therefore to the transcription of distinct genes (Cheung *et al.* 2000; Newton and Duman 2006). Stability of the epigenetic events is another variable: while studies show that chromatin remodeling requires repeated treatments over several days (Cassel *et al.* 2006; Tsankova *et al.* 2006), chromatin can also be rapidly remodeled in response to neuronal stimulation (Chen *et al.* 2003).

In the present study, we demonstrate that modification of the self-administration behavior in response to TsA was accompanied by extensive changes in gene expression. Using Affymetrix oligonucleotide microarrays, we identified 722 probe sets in the CgCx and 136 probe sets in the NAc that were differentially expressed between vehicle and TsA-treated rats that self-administered cocaine. The data obtained in the CgCx are in accord with the conventional view that histone hyperacetylation is actually associated with increased gene expression, because 692 of 722 probe sets were up-regulated by TsA. Surprisingly, this was not the case in the NAc, in which only 25 of 136 probe sets were up-regulated by the HDAC inhibitor. Percentages of differentially expressed probe sets in the CgCx and NAc were about 2.3% and 0.4%, respectively, when compared with the 31 000 probe sets present on rat Genome 230 2.0 oligonucleotide array. The values are consistent with the notion that only a small percentage of genes are differen-

tially expressed in response to HDAC inhibitors. It was shown that exposure of T-cells to TsA did not lead to a generalized increase in transcription but rather to a deregulation of a limited set of genes, suggesting that modulation of chromatin structure by HDACs is a gene-specific event with a variable transcriptional outcome, and that only a few genes (approximately 2%) are regulated primarily through HDAC-dependent mechanisms (Moreira *et al.* 2003). In Michigan Cancer Foundation-7 (MCF7) human breast cancer cells, only 0.44% of the total number of genes analyzed with microarrays were identified as being regulated by TsA (Crabb *et al.* 2008).

We selected five genes in the cortex and two in the NAc to be further characterized. Their regulation was confirmed in the CgCx and NAc using real-time qPCR. Among the genes we found to be differentially regulated in response to HDAC inhibition, some are already known to be regulated by epigenetic mechanisms of gene transcription. On one hand, some are mainly regulated at the level of DNA methylation. This is the case for instance of the 5-HT_{2A} receptor gene in which differential DNA methylation contributes to differential activity of alleles C and T and thereby to genetic association between the polymorphism and psychiatric disorders (Polesskaya *et al.* 2006). This is also the case for the *reelin* gene promoter, which is subject to methylation in the adult nervous system, and perturbations in methylation correlate with alterations in memory formation and cognition (Levenson *et al.* 2008). On the other hand, some genes have

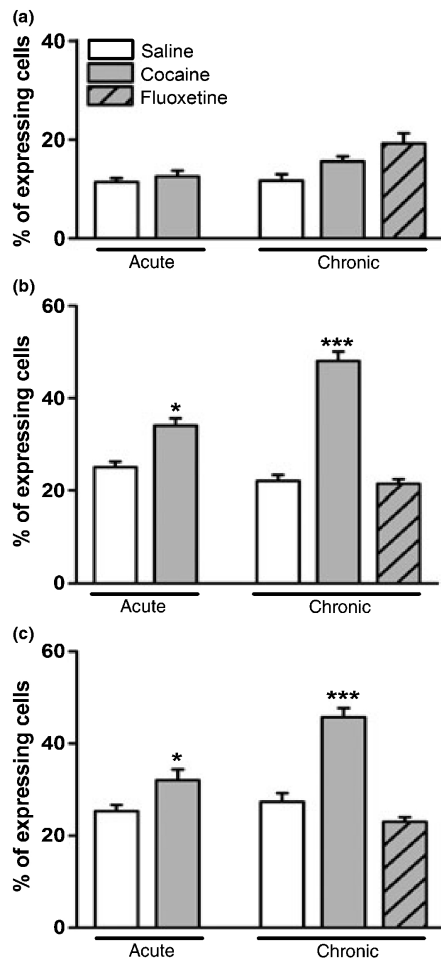


Fig. 5 Immunohistochemistry of reelin in cingulate cortex (CgCx) and nucleus accumbens (NAc). Quantification of reelin immunoreactivity in CgCx (a), NAc core (NAcC) (b) and NAc shell (NAcS) (c) of rats i.p. injected acutely with saline ($n = 4$) or 20 mg/kg cocaine ($n = 4$) or in rats i.p. injected for 10 days (1 injection per day) with saline ($n = 5$), cocaine ($n = 4$) or 10 mg/kg fluoxetine ($n = 4$). Each bar represents the percentage of immunoreactive cells calculated from eight counts on four sections, expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, comparison with saline control rats (ANOVA followed by Student–Newman–Keuls *post hoc* test).

been shown to be regulated by chromatin remodeling resulting from the impact of histone modifications. The fragile X mental retardation gene *FMRI* is known to associate with acetylated histone H3 and H4, with acetylation being reduced in fragile X cells. Histone hyperacetylating drugs such as 4-phenylbutyrate and TsA produce significant gene reactivation, indicating that histone acetylation, together with DNA demethylation, are the main epigenetic switches activating the expression of the *FMRI* gene (Tabolacci *et al.* 2005; Biacsi *et al.* 2008). In addition, activity of the class I histone deacetylase HDAC3 has been

shown to be regulated by dephosphorylation, which is brought about by protein phosphatase type-4, implicating this enzyme in the regulation of chromatin remodeling (Cohen *et al.* 2005). Interestingly, we found the gene encoding the regulatory subunit 2 of protein phosphatase type-4 as being induced in the cortex of rats self-administering cocaine and injected with TsA. It is noteworthy that TSC22, which belongs to a family of leucine zipper-containing transcription factors that can homodimerize and heterodimerize with other family members (Kester *et al.* 1999), was identified as binding to the promoter of the human C-type natriuretic peptide gene in rat pituitary GH3 cells (Ohta *et al.* 1996). Incidentally, we previously reported that injection of C-type natriuretic peptide into the ventral tegmental area strongly reduced cocaine-induced early gene expression in the NAc (Jouvert *et al.* 2004).

From our data on gene expression at the messenger level, the most salient gene induced by TsA in the prefrontal cortex was *Lis1*. The product of *Lis1* gene corresponds to a regulatory subunit constituting, together with two catalytic subunits, the G-protein-like complex named type I platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform 1b (Arai *et al.* 2002). *Lis1* is implicated in the normal layering of the developing cerebral cortex and mutations within the gene cause type I lissencephaly (Reiner *et al.* 1993), a human brain malformation characterized essentially by a disordered organization of the cortical layers believed to result from a defect in neuronal migration (Barth 1987). Using immunohistochemistry, we validated data generated by the microarray procedure by confirming that TsA increased by 2.0-fold the amount of cells expressing *Lis1* protein in the CgCx. In contrast, *Lis1* protein was induced by cocaine intake and inhibited by TsA in the core and shell NAc subregions of rats taking cocaine. The differential regulation of *Lis1* gene in cortex and NAc may be attributed to a differential expression pattern of the transcription factors that regulate *Lis1* expression in these brain structures. Surprisingly, it appeared that this gene identified as being induced by TsA in self-administering rats was already largely activated upon cocaine self-injections, at both the mRNA and protein levels. The observation strongly suggests that cocaine regulates gene expression through epigenetic mechanisms involving histone acetylation. To substantiate the latter data, we measured *Lis1* protein expression in response to the non-contingent administration of cocaine and of the antidepressant fluoxetine. We found that i.p. cocaine administration also induced the *Lis1* gene in the CgCx, CPu and NAc, to a greater extent after multiple injections than after a single injection, showing that the induction is not restricted to cocaine self-intake. The fact that the selective 5-HT uptake inhibitor fluoxetine provoked an effect very similar to that of cocaine suggests that the serotonergic system is involved in the cocaine-induced *Lis1* gene expression.

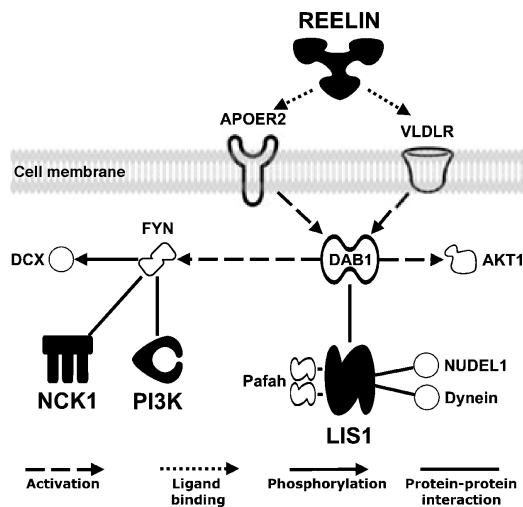


Fig. 6 Schematic reelin-induced signal transduction pathway. The four genes encoding proteins which are filled in black (reelin, Lis1, NCK, PI3K) were induced by trichostatin A (TsA) in rats self-administering cocaine. The network modeling approach was realized using Ingenuity Pathway Analysis. AKT1, Rac- α ser/thr protein kinase 1; APOER2, apolipoprotein E receptor 2; DAB1, disabled homolog 1; DCX, doublecortin; FYN, tyrosine kinase related to SRC; NCK1, non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1; NUDEL1, nudE nuclear distribution gene E homolog-like 1; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; VLDLR, very low-density lipoprotein receptor.

We also characterized immunohistochemically the expression of the *reelin* gene in the same groups of rats as those used for measuring *Lis1* expression. The gene was selected because it was significantly silenced in the NAc in response to TsA in rats self-administering cocaine and also because it is functionally related to *Lis1*. The fact that the genes belong to the same transduction pathway could explain why mutations in *reelin* and *Lis1* genes lead to a similar lissencephaly phenotype (Assadi *et al.* 2003). Our immunohistochemical results validate data generated by the microarray and real-time qPCR procedures, by confirming that TsA did decrease the amount of cells expressing reelin protein in the NAc subregions. Reelin was induced by TsA in the CgCx of rats taking cocaine, indicating that reelin protein was regulated in an opposite way by TsA between cortex and NAc. Reelin is known to enhance synaptic plasticity by binding to its constituent receptors coupled to the intracellular signaling machinery that involves the protein Dab1 controlling *Lis1*, PI3K, Crk, N-WASP and *Nck β* proteins (Zhang *et al.* 2007). Interestingly, among the genes regulated by TsA in the microarray experiment, we also found *Nck1* and the phosphatidylinositol 3-kinase *PIK3CA* genes. They were up-regulated 1.4-fold in the CgCx ($p = 0.029$ and 0.021 , respectively). Functional connection between the four proteins, obtained with Ingenuity Pathway Analysis (<http://www.ingenuity.com/>), is illustrated in Fig. 6. Initially

described to play a critical role for neurodevelopment, reelin has been recently shown to play a unique modulatory role in the induction of synaptic plasticity in the adult brain. The highly regulated expression pattern of reelin in the adult brain in regions implicated in memory formation, suggests that reelin is crucial for cognitive function in general (Levenson *et al.* 2008). This is attested by the fact that deficiency in reelin expression is associated with a number of psychiatric disorders (Fatemi *et al.* 2000; Guidotti *et al.* 2000).

It is noteworthy that expression of *Lis1* and reelin in response to HDAC inhibition in rats taking cocaine was well correlated. Their expression was increased by TsA in the CgCx and declined in the NAc core and shell. This shows that reelin ligand and one of its signal transduction elements are similarly regulated and highlights this signal transduction pathway as an important effector underlying the TsA effect, which is to decrease the motivation of the rats to self-administer cocaine. Our data further highlight epigenetic regulation of transcription as a critical mechanism taking place in this system to subserve plasticity and memory formation.

Acknowledgements

We thank Arielle Ferrandon and Marie-Odile Revel for technical assistance. Funding for this study was provided by INSERM and by the Université de Strasbourg. All authors declare that they have no conflicts of interest. They declare that no financial support or compensation has been received from any individual or corporate entity over the past 3 years for research or professional service, except for income received from their primary employers.

References

Arai H., Koizumi H., Aoki J. and Inoue K. (2002) Platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH). *J. Biochem.* **131**, 635–640.

Assadi A. H., Zhang G., Beffert U. *et al.* (2003) Interaction of reelin signaling and *Lis1* in brain development. *Nat. Genet.* **35**, 270–276.

Barth P. G. (1987) Disorders of neuronal migration. *Can. J. Neurol. Sci.* **14**, 1–16.

Benjamini Y., Drai D., Elmer G., Kafkafi N. and Golani I. (2001) Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav. Brain Res.* **125**, 279–284.

Biacsi R., Kumari D. and Usdin K. (2008) SIRT1 inhibition alleviates gene silencing in Fragile X mental retardation syndrome. *PLoS Genet.* **4**, e1000017.

Bolla K. I., Eldreth D. A., London E. D. *et al.* (2003) Orbitofrontal cortex dysfunction in abstinent cocaine abusers performing a decision-making task. *Neuroimage* **19**, 1085–1094.

Caine S. B., Lintz R. and Koob G. F. (1993) Intravenous drug self-administration techniques in animals, in *Behavioral Neuroscience: A Practical Approach* (Sahgal A., ed.), Vol. 2, pp. 117–143. Oxford University Press, Oxford, UK.

Cassel S., Revel M. O., Kelche C. and Zwiller J. (2004) Expression of the methyl-CpG-binding protein MeCP2 in rat brain. An ontogenetic study. *Neurobiol Dis.* **15**, 206–211.

- Cassel S., Carouge D., Gensburger C., Anglard P., Burgun C., Dietrich J. B., Aunis D. and Zwiller J. (2006) Fluoxetine and cocaine induce the epigenetic factors MeCP2 and MBD1 in adult rat brain. *Mol. Pharmacol.* **70**, 487–492.
- Chen W. G., Chang Q., Lin Y., Meissner A., West A. E., Griffith E. C., Jaenisch R. and Greenberg M. E. (2003) Derepression of BDNF transcription involves calcium-dependent phosphorylation of MeCP2. *Science* **302**, 885–889.
- Cheung P., Allis C. D. and Sassone-Corsi P. (2000) Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell* **103**, 263–271.
- Childress A. R., Mozley P. D., McElgin W., Fitzgerald J., Reivich M. and O'Brien C. P. (1999) Limbic activation during cue-induced cocaine craving. *Am. J. Psychiatry* **156**, 11–18.
- Chomczynski P. and Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156–159.
- Cohen P. T., Philp A. and Vazquez-Martin C. (2005) Protein phosphatase 4 – from obscurity to vital functions. *FEBS Lett.* **579**, 3278–3286.
- Colvis C. M., Pollock J. D., Goodman R. H. *et al.* (2005) Epigenetic mechanisms and gene networks in the nervous system. *J. Neurosci.* **25**, 10379–10389.
- Crabb S. J., Howell M., Rogers H. *et al.* (2008) Characterisation of the in vitro activity of the depsi-peptide histone deacetylase inhibitor spiruchostatin A. *Biochem. Pharmacol.* **76**, 463–475.
- Di Chiara G. and Imperato A. (1988) Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **85**, 5274–5278.
- Fatemi S. H., Earle J. A. and McMenomy T. (2000) Reduction in Reelin immunoreactivity in hippocampus of subjects with schizophrenia, bipolar disorder and major depression. *Mol. Psychiatry* **5**, 654–663.
- Goldstein R. Z. and Volkow N. D. (2002) Drug addiction and its underlying neurobiological basis: neuroimaging evidence for the involvement of the frontal cortex. *Am. J. Psychiatry* **159**, 1642–1652.
- Guidotti A., Auta J., Davis J. M. *et al.* (2000) Decrease in reelin and glutamic acid decarboxylase67 (GAD67) expression in schizophrenia and bipolar disorder: a postmortem brain study. *Arch. Gen. Psychiatry* **57**, 1061–1069.
- Irizarry R. A., Bolstad B. M., Collin F., Cope L. M., Hobbs B. and Speed T. P. (2003) Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res.* **31**, e15.
- Jenuwein T. and Allis C. D. (2001) Translating the histone code. *Science* **293**, 1074–1080.
- Jouvert P., Revel M. O., Lazaris A., Aunis D., Langley K. and Zwiller J. (2004) Activation of the cGMP pathway in dopaminergic structures reduces cocaine-induced EGR-1 expression and locomotor activity. *J. Neurosci.* **24**, 10716–10725.
- Kester H. A., Blanchetot C., den Hertog J., van der Saag P. T. and van der Burg B. (1999) Transforming growth factor-beta-stimulated clone-22 is a member of a family of leucine zipper proteins that can homo- and heterodimerize and has transcriptional repressor activity. *J. Biol. Chem.* **274**, 27439–27447.
- Kim W. Y., Kim S. and Kim J. H. (2008) Chronic microinjection of valproic acid into the nucleus accumbens attenuates amphetamine-induced locomotor activity. *Neurosci. Lett.* **432**, 54–57.
- Koob G. F. (1992) Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends Pharmacol. Sci.* **13**, 177–184.
- Kumar A., Choi K. H., Renthal W. *et al.* (2005) Chromatin remodeling is a key mechanism underlying cocaine-induced plasticity in striatum. *Neuron* **48**, 303–314.
- LeSage M. G., Stafford D. and Glowa J. R. (1999) Preclinical research on cocaine self-administration: environmental determinants and their interaction with pharmacological treatment. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **23**, 717–741.
- Levenson J. M., Qiu S. and Weeber E. J. (2008) The role of reelin in adult synaptic function and the genetic and epigenetic regulation of the reelin gene. *Biochim. Biophys. Acta* **1779**, 422–431.
- Malvaez M., Sanchis-Segura C., Vo D., Lattal K. M. and Wood M. A. (2009) Modulation of chromatin modification facilitates extinction of cocaine-induced conditioned place preference. *Biol. Psychiatry* **67**, 36–43.
- Millenaar F. F., Okyere J., May S. T., van Zanten M., Voeseek L. A. and Peeters A. J. (2006) How to decide? Different methods of calculating gene expression from short oligonucleotide array data will give different results. *BMC Bioinformatics* **7**, 137.
- Moreira J. M., Scheipers P. and Sorensen P. (2003) The histone deacetylase inhibitor trichostatin A modulates CD4+ T cell responses. *BMC Cancer* **3**, 30.
- Nestler E. J. (2001) Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 119–128.
- Newton S. S. and Duman R. S. (2006) Chromatin remodeling: a novel mechanism of psychotropic drug action. *Mol. Pharmacol.* **70**, 440–443.
- Ohta S., Shimekake Y. and Nagata K. (1996) Molecular cloning and characterization of a transcription factor for the C-type natriuretic peptide gene promoter. *Eur. J. Biochem.* **242**, 460–466.
- Pepper S. D., Saunders E. K., Edwards L. E., Wilson C. L. and Miller C. J. (2007) The utility of MAS5 expression summary and detection call algorithms. *BMC Bioinformatics* **8**, 273.
- Pesold C., Impagnatiello F., Pisu M. G., Uzunov D. P., Costa E., Guidotti A. and Caruncho H. J. (1998) Reelin is preferentially expressed in neurons synthesizing gamma-aminobutyric acid in cortex and hippocampus of adult rats. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **95**, 3221–3226.
- Polesskaya O. O., Aston C. and Sokolov B. P. (2006) Allele C-specific methylation of the 5-HT2A receptor gene: evidence for correlation with its expression and expression of DNA methylase DNMT1. *J. Neurosci. Res.* **83**, 362–373.
- Reiner O., Carrozzo R., Shen Y., Wehnert M., Faustina F., Dobyns W. B., Caskey C. T. and Ledbetter D. H. (1993) Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein beta-subunit-like repeats. *Nature* **364**, 717–721.
- Ritz M. C., Lamb R. J., Goldberg S. R. and Kuhar M. J. (1987) Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine. *Science* **237**, 1219–1223.
- Roberts D. C. and Koob G. F. (1982) Disruption of cocaine self-administration following 6-hydroxydopamine lesions of the ventral tegmental area in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **17**, 901–904.
- Robinson T. E. and Berridge K. C. (2001) Incentive-sensitization and addiction. *Addiction* **96**, 103–114.
- Ronnie P., Host L., Gobaille S., Sandner G., Aunis D. and Zwiller J. (2008) Histone deacetylase inhibitors decrease cocaine but not sucrose self-administration in rats. *J. Neurosci.* **28**, 9342–9348.
- de Ruijter A. J., van Gennip A. H., Caron H. N., Kemp S. and van Kuilenburg A. B. (2003) Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem. J.* **370**, 737–749.
- Tabolacci E., Pietrobono R., Moscato U., Oostra B. A., Chirazzi P. and Neri G. (2005) Differential epigenetic modifications in the FMR1 gene of the fragile X syndrome after reactivating pharmacological treatments. *Eur. J. Hum. Genet.* **13**, 641–648.
- Tsankova N. M., Berton O., Renthal W., Kumar A., Neve R. L. and Nestler E. J. (2006) Sustained hippocampal chromatin regulation in

- a mouse model of depression and antidepressant action. *Nat. Neurosci.* **9**, 519–525.
- Wang L., Lv Z., Hu Z., Sheng J., Hui B., Sun J. and Ma L. (2009) Chronic cocaine-induced H3 acetylation and transcriptional activation of CaMKII α in the nucleus accumbens is critical for motivation for drug reinforcement. *Neuropsychopharmacology*, in press. doi: 10.1038/npp.2009.193.
- White F. J. and Kalivas P. W. (1998) Neuroadaptations involved in amphetamine and cocaine addiction. *Drug Alcohol Depend.* **51**, 141–153.
- Zhang G., Assadi A. H., McNeil R. S., Beffert U., Wynshaw-Boris A., Herz J., Clark G. D. and D'Arcangelo G. (2007) The Pafah1b complex interacts with the Reelin receptor VLDLR. *PLoS ONE* **2**, e252.

5.1. Annexe 1

Parmi les 722 échantillons identifiés dans le CgCx, seuls les 313 correspondant à un gène identifié sont reportés dans le tableau ci-dessous. Les échantillons en gras sont ceux qui ont été validés par la technique de RT-qPCR.

Référence Affymetrix	Rapport TsA / Contrôles	Annotation du gène
1385099_at	2,392857143	Scel
1387839_at	2,352678571	RT1 class Ib gene, H2-TL-like, grc region (N1)
1369818_at	2,236144578	Gabrb2 GABA_Aβ2 receptor
1392997_at	2,069614841	Ppp4r2 protein phosphatase 4, regulatory subunit 2
1392890_at	2,018258775	Pafah1b1 / Lis1 platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform Ib, alpha subunit 45kDa
1385153_at	1,981723238	Zfp68
1394412_at	1,926078029	Tmem16c
1397709_at	1,913934426	PI-3-kinase-related kinase SMG-1
1371039_at	1,864864865	Cacnb4
1394059_s_at	1,828881847	Yme111
1386525_at	1,776119403	Thoc2
1398355_at	1,77251808	LTrpC7 Long transient receptor potential channel 7
1392818_at	1,77140884	Gas5 growth arrest specific 5
1382898_at	1,693121693	Cacnb4
1377345_at	1,687263078	Bbx
1388856_at	1,686084142	Kitl
1397512_at	1,67193507	Vps41 protein
1377664_at	1,66824147	Kab
1399141_at	1,666515426	Clk4 CDC-like kinase 4
1369692_at	1,666092943	Tnr
1392734_at	1,661446682	Nrcam
1393363_at	1,656182988	zinc finger protein 198
1389580_at	1,65474339	Smarca3
1368411_a_at	1,649112598	Mtap2
1399022_at	1,647424684	Clk1 CDC-like kinase 1
1390534_at	1,647249191	Smc511
1368726_a_at	1,641975309	Zfp347
1382691_at	1,640449438	Sf3b1
1368433_at	1,63798768	Sacm11
1370997_at	1,636846767	Homer1

1377828_at	1,635339418	Tmem16c
1368401_at	1,629056131	Gria2 glutamate receptor, ionotropic, AMPA2
1389684_at	1,628648649	Prpf39
1368817_at	1,627764128	Psme4
1376641_at	1,624921334	Thoc1
1370534_at	1,622820919	Acvr1c
1393459_at	1,614908579	Fmr1 fragile X mental retardation syndrome 1
1383098_at	1,602060707	Fyttd1
1395523_at	1,60158066	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G
1372327_at	1,596237589	Myef2
1391211_at	1,595061728	Atp11c
1383085_at	1,594724221	Sh3bgrl
1374405_at	1,592475941	Hnrpa3
1388850_at	1,591776571	Hspca
1383236_at	1,591033852	Fxr1h fragile X mental retardation gene 1
1368712_at	1,588145897	Znf386
1398440_at	1,579657499	SR rich protein
1393631_at	1,575268817	Mtf2
1372817_at	1,568965517	Zfp260
1372830_at	1,568008328	PI-3-kinase-related kinase SMG-1
1369125_at	1,567854909	Htr2a 5-hydroxytryptamine receptor 2A
1377836_at	1,562860438	suppressor of hairy wing homolog 4 isoform 1
1368843_at	1,559241706	Yme111
1389153_at	1,551633987	Serbp1
1391101_at	1,547445255	Arhgap12
1388022_a_at	1,547280335	Dnm11
1374422_at	1,541072641	Erbp2 interacting protein isoform 2
1395165_at	1,539655172	Psip1
1387224_at	1,538745387	Dgkb
1378543_at	1,53828033	Hnrpa2b1
1393780_at	1,530677291	Zfp131
1382238_at	1,530232558	cell division cycle and apoptosis regulator 1
1392199_at	1,52892562	Dd5
1376864_at	1,528656126	cell division cycle

		and apoptosis regulator 1
1387080_at	1,528190937	Cspg6
1396171_at	1,52761194	Ppil4
1382161_at	1,526690391	Mphosph10
1395725_at	1,522532189	phospholipase A2 gamma
1392995_at	1,520681265	zinc finger protein 322a
1373466_at	1,520186335	Cast
1398948_at	1,518849547	Tax1bp1
1379433_at	1,518386714	Pik3c2a phosphatidylinositol 3-kinase, C2 domain
1378002_at	1,515789474	Hspa4l
1382551_at	1,515075377	Intersectin-2
1391709_at	1,51305483	zinc finger protein 11b (KOX 2)
1368038_at	1,509113924	Synj2bp
1382629_at	1,508255564	Mlst2
1373534_at	1,50694864	SR rich protein
1368426_at	1,504158965	Crot
1399101_at	1,503963488	Rnpc2
1374585_at	1,499801035	Echdc1
1369059_at	1,499111901	Trpm7 transient receptor potential-related protein 7
1391653_at	1,498822457	Gabrg2 GABA _A γ2 receptor
1371064_at	1,49729364	Pcm1
1383514_s_at	1,49704142	Narg1
1373143_at	1,492874109	hypothetical protein FLJ10652
1393813_at	1,492355297	Ttc3
1376887_at	1,490634441	ZFP
1371060_at	1,488549618	Trim23
1394783_at	1,482690406	Dcun1d1
1383144_at	1,481595092	Trnt1
1368994_a_at	1,478519498	Garnl1
1382540_at	1,47751606	Prpf40a
1379101_at	1,477464449	Dhx36
1368228_at	1,476481008	Zfp265
1372806_at	1,475594307	Vps35
1372143_at	1,475340818	Ube2v2
1370455_a_at	1,474658644	Olfm3
1399046_at	1,47366212	topoisomerase (DNA) I
1377785_at	1,472627737	Dhx40
1375185_at	1,471448468	Ipo7
1368060_at	1,469574583	Hrsp12
1372733_at	1,466836052	phospholipase A2 gamma
1372463_at	1,464386052	Fcho2
1395866_at	1,463768116	Zinc finger protein ZFP
1383226_at	1,463071512	Zfx
1369246_a_at	1,463013699	Npy5r

1392792_at	1,462654097	Taf1
1368658_at	1,462482947	Cntf
1369210_at	1,462339744	Scn1a
1385059_at	1,453125	Zfp655
1376599_at	1,452566096	Atad2
1384469_at	1,450435504	Abca5
1387397_at	1,449035813	Aqp4
1382646_at	1,448514851	Prpf4b
1375666_at	1,446724024	Dmtf1
1392502_at	1,446058091	Ahctf1
1373145_at	1,445921249	Vps41 protein
1388680_at	1,442676548	C1galt1c1
1371579_at	1,442374106	signal peptidase complex subunit 3 homolog
1397184_at	1,44230027	intracellular protein transport like
1371367_at	1,441191067	Tardbp
1387841_at	1,44	Exoc5
1382521_at	1,437547893	Gls
1388420_at	1,436294896	topoisomerase (DNA) II
1387405_at	1,43576501	Garnl1
1391208_at	1,435716802	Pcdh20
1387436_at	1,435468721	Septin7
1374401_at	1,435450466	Snx2
1377670_at	1,434311224	Pcf11
1372709_at	1,433992864	Bcap29
1388331_at	1,430937785	Tra1
1374591_at	1,429844738	protein tyrosine phosphatase
1385194_at	1,424311927	Rb1cc1
1379388_at	1,422905305	Snx13
1374567_at	1,42186452	Psyc2
1376169_at	1,418934911	PHD finger protein 20-like 1 isoform 1
1382332_at	1,417844523	Stag2
1379441_at	1,417296786	Zfp294
1373087_at	1,414444444	March7
1390217_at	1,413103928	Garnl1
1390127_at	1,413058741	Dixdc1
1387055_at	1,409256662	Appbp1
1377029_at	1,408278457	Rora
1397892_at	1,407132932	Eif1a
1387026_at	1,405777628	Smc1l1
1387247_at	1,405405405	Pcsk1
1373507_at	1,404924761	acyl-Coenzyme A binding domain containing 5
1387171_at	1,404518899	Gria2 glutamate receptor, ionotropic, AMPA2
1370357_at	1,403811985	Slc30a4
1395584_at	1,402798601	Zinc finger CCCH-type domain-containing protein 11A
1380828_at	1,402275465	Gabra1

		GABA _A α1 receptor
1383256_at	1,402157165	Dnttip2
1384323_at	1,401078749	Psmc6
1373196_at	1,401055858	Efha2
1375984_at	1,398903358	Zfhx4
1387029_at	1,390650188	Cfh
1387440_at	1,390322581	Ireb2
1388975_at	1,390033584	Sucla2
1371893_at	1,390022338	Col4a3bp
1398993_at	1,389773366	Rnpc2 RNA-binding region containing 2
1389968_at	1,389451477	Eif3s10
1390820_at	1,38941076	Zcchc11
1390874_at	1,388812155	Ireb2
1376619_at	1,388387732	protein tyrosine phosphatase
1393299_at	1,386933462	Dpp10
1368256_at	1,385615097	Serpini1
1397535_at	1,385503232	Mpp5
1368151_at	1,385380328	Matr3
1373940_at	1,384293531	Nck1
1390234_at	1,383852364	Sf3b1
1393041_at	1,383792049	Smc211
1372827_at	1,383331678	Ppid
1389143_at	1,381804281	Pik3ca phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, alpha polypeptide
1372558_at	1,379766537	Narg1
1389316_at	1,379409171	Usp9x
1379269_at	1,375816993	Cd2ap
1373549_at	1,375	Ddx10
1389524_at	1,374751208	Ythdf3
1376010_at	1,372904091	Prpf4b
1382045_at	1,372698698	Tbc1d15
1379041_at	1,371828666	Pik3ca phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, alpha polypeptide
1398906_at	1,371464968	sedlin-like
1389996_at	1,370159453	Nek1
1395155_at	1,369090909	Exoc5
1374580_at	1,368352365	Senp6
1390858_at	1,366761019	Vcpip1
1373016_at	1,365891234	Dld
1368427_at	1,364955033	Akap11
1372130_at	1,364525595	Arfgef1
1373836_at	1,362817019	Fyttd1
1393458_s_at	1,361724501	PHD finger protein 14 isoform 1
1383112_at	1,361673414	Trps1
1388424_at	1,356361623	Eif3s1
1368175_at	1,353185596	Zhx1
1369649_at	1,352969395	Cacna2d1
1399018_at	1,352702703	cisplatin resistance- associated overexpressed protein

1399036_at	1,351312988	Usp47
1372394_at	1,351140229	HECT domain containing 1
1370609_a_at	1,349958437	Slc16a7
1379438_at	1,349823322	Smarcad1
1387101_at	1,34937912	Acsl4
1393051_at	1,346925566	40S ribosomal protein S29
1373029_at	1,345596689	Cops2
1397173_at	1,344034499	Serine/threonine- protein kinase WNK3 (Protein kinase, lysine-deficient 3)
1397373_at	1,343623071	hypothetical protein FLJ14503
1368818_at	1,342277012	Psme4
1391866_at	1,341584158	Npat
1388465_at	1,340991536	LEA_4 domain containing protein RGD1359600
1398536_at	1,340397351	Zfp655
1392054_at	1,339386349	polybromo-1
1382556_a_at	1,339225273	DIP13 alpha
1383736_at	1,339183056	Elavl2
1367980_at	1,338656106	Rabep1
1372259_at	1,337511606	Dek
1368067_at	1,334806887	Zfp148
1367976_at	1,333244326	Tpp2
1395479_at	1,332719742	Bxdc2
1388953_at	1,331363636	Gnl3
1377842_at	1,331164136	Twistnb
1382400_at	1,330812854	Rlf
1390907_at	1,33059789	zinc finger protein 84 (HPF2)
1381972_at	1,330591775	Crbn
1374156_at	1,330396476	Mpp5
1393309_at	1,329158839	zinc finger protein ZFP
1397688_at	1,327783219	Pcdh9
1393231_at	1,326961484	Ppp4r2
1391040_at	1,326467559	Retinoblastoma- binding protein 8
1392551_at	1,325545171	zinc finger protein ZFP
1393267_at	1,324726135	Psip1
1398483_at	1,324077911	Rgs17
1380317_at	1,32325426	Cdh10
1396117_at	1,323216995	leucine zipper protein 2
1379729_at	1,322851153	Cpsf6
1371139_at	1,322238302	Pls3
1370872_at	1,321459927	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3
1374842_at	1,317813765	Cebpz
1374447_at	1,317613636	Usp9x
1377685_at	1,316516198	establishment of cohesion 1 homolog 1

Résultats Expérimentaux

1383561_at	1,315637066	Lig4
1388196_at	1,311775656	Nckap1
1382009_at	1,30859662	Chd1
1397812_at	1,306326304	Senp6
1393045_at	1,306184012	Rock2
1385596_at	1,306078537	Tbc1d15
1389734_x_at	1,305189775	RT1-149
1374513_at	1,302373242	Septin7
1389070_at	1,295312108	Trim33
1387977_at	1,293950851	Nbn
1370460_at	1,293243243	Usp15
1384792_at	1,290806754	Prpf40a
1368029_at	1,28611965	Gnai1 /// Gnai3
1383783_at	1,285900551	Pcdh9
1386535_at	1,285791464	Ddx3x
1376298_at	1,284815106	Upf3b
1373116_at	1,283377436	Kpna3
1371823_at	1,282564549	Stag2
1389840_at	1,280339358	Sf3b1
1369903_at	1,279362159	Gabrb3
1392449_at	1,276089828	Rad18
1398970_at	1,275572891	Tloc1
1371973_at	1,274566474	Eif3s6
1385350_at	1,273874632	---
1379449_at	1,272822665	Rb1cc1
1382363_at	1,272077922	Mpp5
1381998_at	1,270345596	Zfp148
1372242_at	1,265249287	Ddx3x
1369904_at	1,256015459	Gabrb1
1373764_at	1,254478976	Zfml
1383768_at	1,252703772	Elavl2
1377001_at	1,241343593	Nrcam
1386229_at	1,234946237	CBF1 interacting corepressor
1377400_at	1,234507042	Hrb2
1377617_at	1,233608647	Pura
1393753_at	1,231413613	Nudcd1
1389141_at	1,228684081	Orc2l
1395616_at	1,226348364	Ab2-008
1399003_at	1,22534219	adipocyte-specific protein 4
1392524_at	1,222984563	Trim23
1379967_at	1,222540592	Zfp367
1389552_at	1,220110847	Lims1
1382741_at	1,218928679	Ube3a
1377906_at	1,216075157	Dhx36
1380638_at	1,211206897	Ncoa3
1390486_at	1,211171662	Usp32
1394041_at	1,211091234	MASK-4E-BP3 protein
1390886_at	1,21085595	Ccdc39
1382721_at	1,209400984	Zfp403
1381259_at	1,209145427	Stag1
1382307_at	1,208821887	Ppp1r12a
1373157_at	1,208625878	Usp47
1369654_at	1,20746888	Prkaa2

1390489_at	1,206392384	Syncrip
1388820_at	1,202363794	modulator of estrogen induced transcription
1398611_at	1,1901566	Cul4b
1389685_at	1,189965792	Zfp655
1374956_at	1,181458591	Pcm1
1373004_at	1,174214418	Dnajc2
1390945_at	1,172496025	Znf292
1384523_at	1,157216495	postmeiotic segregation increased 1
1386096_at	1,144297636	Mtf2
1388161_at	1,109722977	Adam10
1370465_at	1,089219331	Abcb1a
1370705_at	0,830864198	Zfp597
1391139_at	0,783783784	ADAMTS-like 1 isoform 1
1372923_at	0,780546327	Pex11b peroxisomal biogenesis factor 11b
1398729_s_at	0,696517413	nucleolar protein with MIF4G domain 1
1387365_at	0,64244186	Nr1h3
1385625_at	0,598418278	Efemp2
1394160_at	0,591715976	Tmem2 transmembrane protein 2
1398245_at	0,544320913	Sncg
1371033_at	0,506302521	RT1-Bb
1369427_at	0,460992908	Mpeg1

5.2. Annexe 2

Parmi les 136 échantillons identifiés dans le NAc, seuls les 48 correspondant à un gène identifié sont reportés dans le tableau ci-dessous. Les échantillons en gras sont ceux qui ont été validés par la technique de RT-qPCR

Référence Affymetrix	Rapport TsA / Contrôles	Annotation du gène
1375958_at	2,64321608	TSC22 domain family protein 4
1368247_at	2,353236607	Hspa1a
1370912_at	1,65569347	Hspa1b
1385397_at	1,633136095	Ab1-219
1382478_at	1,53592233	Btdb3
1373410_at	1,47438904	myocyte enhancer factor 2C
1368945_at	1,152317881	Bmp2
1378362_at	1,14562212	Gliacolin
1391309_at	0,982305117	Gliacolin
1372923_at	0,880332286	Pex11b peroxisomal biogenesis factor 11b
1396214_at	0,850609756	Kitl
1379029_at	0,825806452	Zfp62
1392421_at	0,783861671	Baz2b
1392038_at	0,762425447	PI-3-kinase-related kinase SMG-1
1368050_at	0,753300088	Ccn1l
1379941_at	0,752535497	vacuolar protein sorting 13C protein
1373957_at	0,743661972	Reelin
1393678_at	0,738219895	CG10084-PA
1394160_at	0,72407045	Tmem2 transmembrane protein 2
1394477_at	0,716651611	nucleolar protein with MIF4G domain 1
1395561_at	0,712422563	Hnrpa2b1
1369285_at	0,710512688	Pggt1b
1372693_at	0,705504365	Hnrpa1
1398354_at	0,70152856	Ctnnal1
1378581_at	0,697594502	Hiplr
1395523_at	0,69654873	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G
1388476_at	0,690209589	Tial1
1384333_at	0,690127971	ARP2 actin-related protein 2 homolog
1387345_at	0,683941606	Psme4
1369059_at	0,67961165	Trpm7 transient receptor potential-related protein 7
1376760_at	0,673526334	GC-rich sequence DNA-binding factor
1370705_at	0,672453704	Zfp597
1369068_at	0,660633484	Cul5

1381676_at	0,659963437	Nrxn3
1398993_at	0,626610129	Rnpc2 RNA-binding region containing 2
1372830_at	0,618084097	PI-3-kinase-related kinase SMG-1
1399141_at	0,614015065	Clk4 CDC-like kinase 4
1374204_at	0,607369416	Wsb1
1399022_at	0,601462271	Clk1 CDC-like kinase 1
1368712_at	0,595037221	Znf386
1370995_at	0,577325581	Pou2f1
1378595_at	0,570536511	Sfpq
1373540_at	0,52337753	Hnrpa2b1
1373534_at	0,511840104	SR rich protein
1392818_at	0,508522727	Gas5 growth arrest specific 5
1385158_at	0,50258565	chromatin modifying protein 1B
1369093_at	0,498132005	Reelin
1397697_at	0,495700246	Eif4a2

5.3. Résultats complémentaires

5.3.1. La Reeline et Lis1 sont régulés par la TsA dans le CPu

La figure C1 complète les résultats exposés dans les figures 2 et 4 de l'article. Dans le CPu, les protéines Lis1 (Fig. C1a) et Reeline (Fig. C1b) sont induites par l'AA de cocaïne ; cette induction est supérieure quand les rats sont traités par 0,3 mg/kg de TsA avant chaque session d'AA. Les effets induits par la TsA dans le CPu sont similaires à ceux retrouvés dans le CgCx.

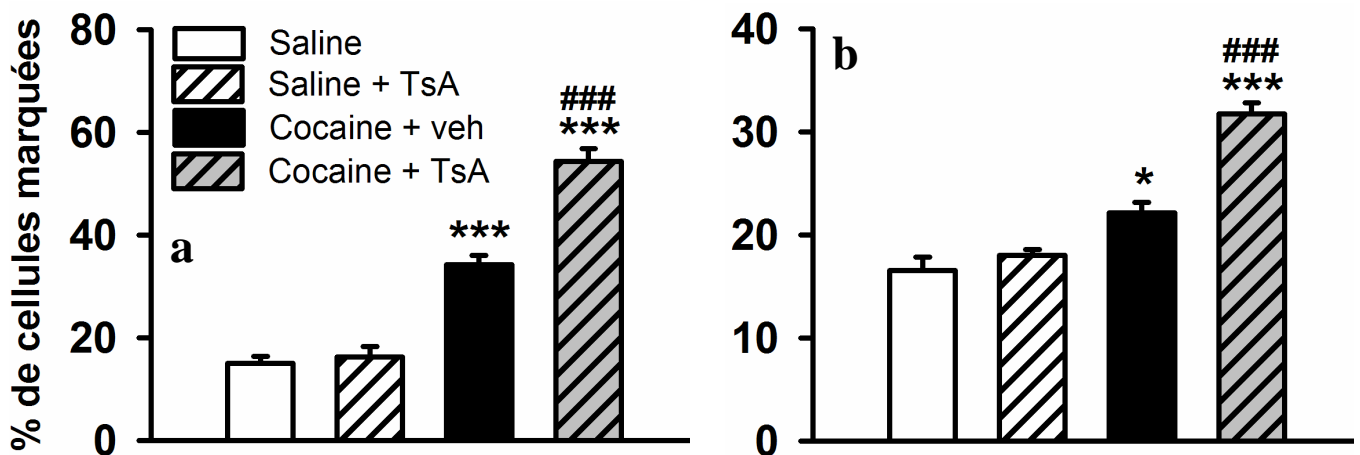


Fig. C1 Immunohistochimie de Lis1 (a) et de la Reeline (b) dans le CPu.

La quantification de Lis1 ou de la Reeline a été effectuée chez des rats « s'auto-administrant » du NaCl 0,9% (Saline) ou des rats s'auto-administrant de la cocaïne (Cocaïne). La TsA (0,3 mg/kg) ou la solution véhicule (veh ; 10% DMSO) ont été injectées en i.v. 30 min avant les sessions d'AA. Le pourcentage de cellules immunoréactives est exprimé comme moyenne \pm erreur-type (n = 4 par groupe). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ et *** $p \leq 0,001$ en comparaison avec le groupe « Saline ». ### $p \leq 0,001$ en comparaison avec le groupe « Cocaïne + veh » (ANOVA suivie d'un test de comparaison multiple de Student-Newman-Keuls).

5.3.2. La Reeline et Lis1 sont régulés par la fluoxétine dans le CPu

La figure C2 complète les résultats exposés dans les figures 3 et 5 de l'article. Dans le CPu, les protéines Lis1 (Fig. C2a) et Reeline (Fig. C2b) sont induites par une injection i.p. unique de cocaïne et encore plus fortement par des injections répétées de la drogue. Les injections répétées de fluoxétine induisent l'expression de Lis1, mais pas de la Reeline. Il apparaît que les effets observés dans le CPu sont très similaires à ceux obtenus dans les deux sous-régions du NAc.

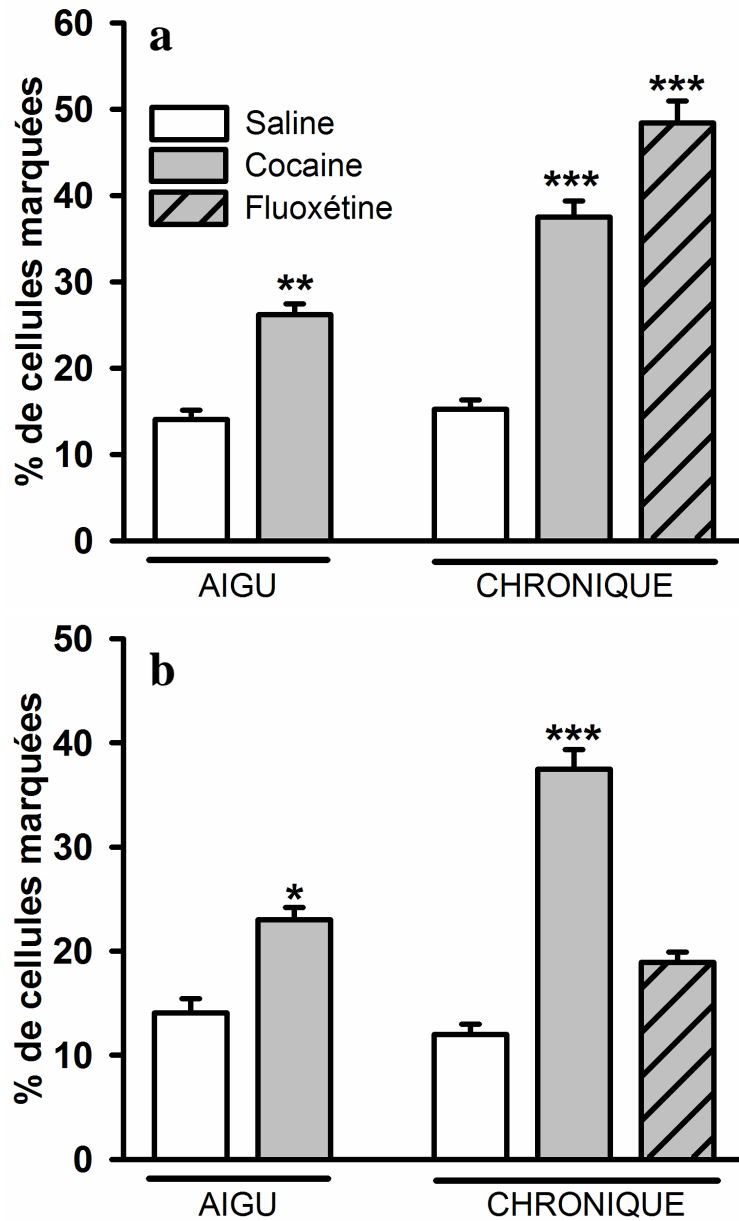


Fig. C2 Effets d'un traitement aigu ou chronique par la cocaïne ou par la fluoxétine sur l'expression de Lis1 (a) et de la Reeline (b) dans le CPU.

Les rats ont été traités, soit par une injection i.p. unique (aigu ; NaCl 0,9%, Cocaïne 20 mg/kg), soit par des injections répétées pendant dix jours (chronique ; NaCl 0,9%, Cocaïne 20 mg/kg ; Fluoxétine 10 mg/kg). Ils ont été euthanasiés 2 h après la dernière injection. Le pourcentage de cellules immunoréactives est exprimé comme moyenne \pm erreur-type (n = 6 par groupe). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ et *** $p \leq 0,001$ en comparaison avec groupe « Saline » correspondant (ANOVA suivie d'un test de comparaison multiple de Student-Newman-Keuls).

C. Discussion

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes attachés à étendre notre compréhension de l'implication des mécanismes de régulation épigénétique et plus particulièrement des HDAC dans les effets des drogues. En effet, l'injection de cocaïne, en i.p. pendant dix jours, augmente l'expression des protéines de liaison à l'ADN méthylé MeCP2 et MBD1, de HDAC2, mais diminue le niveau d'acétylation de l'histone H3 (Cassel *et al.*, 2006). Pour poursuivre nos travaux, nous avons eu recours à un ensemble d'approches complémentaires :

- Comportementales, avec l'AA de cocaïne / saccharose en FR1 et PR, la mesure d'activité locomotrice, la mesure de la CPP et de la CPA induite par la nicotine
- Pharmacologique, en utilisant différents inhibiteurs de HDAC
- Biochimique en mesurant les activités enzymatiques nucléaires des HDAC dans différentes structures cérébrales
- Génomique par la technique des microarrays pour analyser l'expression différentielle d'environ 28000 gènes dans le CgCx et le NAc de rats s'auto-administrant de la cocaïne et traités par la TsA
- Biomoléculaire avec la technique de RT-qPCR, utilisée dans un premier temps pour valider les résultats obtenus par microarrays et ensuite pour étudier l'expression des différentes HDAC chez les rats s'auto-administrant de la cocaïne,
- Immunohistochimique, afin de déterminer le profil d'expression des protéines HDAC2, 5 et 11, Lis1 et Reeline dans différentes structures cérébrales.

1. Effets de l'inhibition des HDAC sur l'AA de cocaïne

1.1. Justification des protocoles utilisés

Afin de déterminer l'implication des HDAC dans les effets comportementaux de la cocaïne, nous avons eu recours à la technique d'AA de cocaïne par le rat. Ce modèle animal permet d'étudier les propriétés renforçantes des drogues, qui se manifestent par un comportement actif de l'animal en vue de se procurer la drogue. L'infusion de drogue renforce la réponse de l'animal de façon contingente et induit un comportement qui déclenche l'infusion suivante. Dans nos études, deux protocoles ont été principalement utilisés: le FR1 et le PR.

1.1.1. Ratio fixe

Dans les programmes de renforcement en FR, l'animal doit effectuer un nombre fixe et prédéfini de réponses pour obtenir chaque infusion de drogue (LeSage *et al.*, 1999). L'ensemble des expériences effectuées avec le protocole de FR ont été réalisées en FR1 et

non en FR5 (5 pressions sur un levier / introductions du museau dans l'orifice pour obtenir une infusion de drogue). En effet avant de passer à un protocole de FR5, les animaux sont toujours d'abord entraînés en FR1 pendant plusieurs sessions. Or, vu que notre objectif était de tester l'effet de l'inhibition des HDAC sur l'acquisition du comportement d'AA (plus précisément dès la première rencontre de l'animal avec la drogue), nous avons eu recours au protocole de FR1. C'est pour cette raison aussi que les différents HDACi ont été injecté avant même la première session d'AA, c'est à dire avant le premier contact de l'animal avec la cocaïne.

Un second point important concernant le FR, c'est qu'il n'est pas possible d'aboutir à une conclusion nette en n'injectant qu'une seule dose de drogue. Cela est dû au fait que la courbe dose-réponse est en forme de U inversé. Cette relation reflète l'interaction entre les effets renforçants de la cocaïne et ses effets locomoteurs et aversifs (*LeSage et al., 1999*). Pour certains, les propriétés renforçantes prédomineraient dans la partie ascendante de la courbe, alors que dans la portion descendante, les effets locomoteurs (stéréotypies) apparaîtraient et limiteraient le niveau de réponse des animaux. Pour d'autres, la partie descendante résulterait de l'effet aversif des fortes doses, vu que les animaux apprennent à éviter les très fortes doses (*Spealman, 1979*). La partie descendante pourrait aussi refléter un effet de satiété (*Wise, 1987*).

Suite à un traitement pharmacologique, les effets observés sur la courbe dose-réponse peuvent être multiples. La courbe peut être décalée vers le haut ou vers le bas pour l'ensemble des doses. Selon une théorie qui veut que les animaux compensent le changement des effets ressentis en modifiant la quantité consommée, une augmentation de la consommation reflèterait une diminution des effets renforçants de la drogue et vice versa (*Yokel and Wise, 1978*). Selon une théorie plus récente, qui ne prend pas en compte la capacité de compensation des animaux (*LeSage et al., 1999*), chacun des déplacements de la courbe peut être interprété différemment. Un décalage vers le haut suggèrerait une augmentation des effets renforçants alors qu'un décalage vers le bas signifierait soit une diminution des effets renforçants de la drogue, soit une perturbation générale des capacités locomotrices des animaux. Enfin selon cette théorie, un décalage vers la gauche supposerait une augmentation des propriétés renforçantes, alors qu'un décalage vers la droite supposerait soit une diminution soit une perturbation des capacités locomotrices (Figure 22).

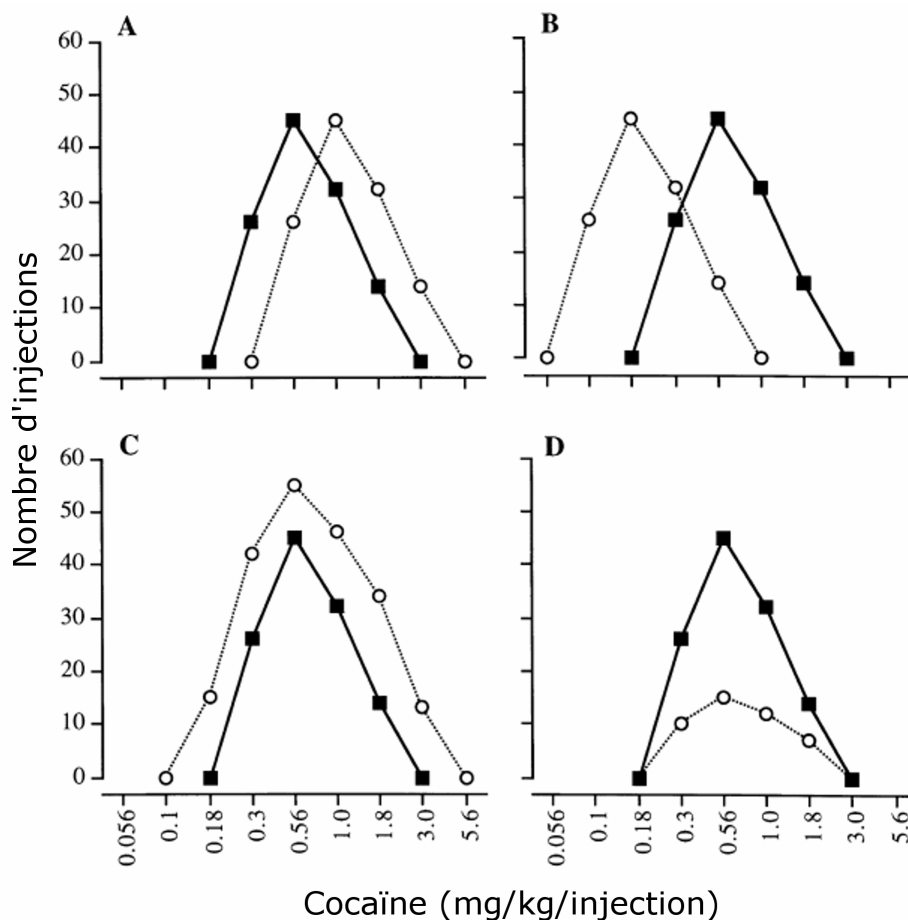


Figure 23 : **Effet potentiel d'une intervention comportementale ou pharmacologique sur la courbe dose-réponse de la cocaïne**

Les carrés noirs représentent le nombre moyen d'injections par session en l'absence de traitement, alors que les cercles blancs représentent le nombre moyen d'injections par session suite à un traitement. Chaque graphique représente un déplacement différent possible de la courbe : vers la droite (A), vers la gauche (B), vers le haut (C) et vers le bas (D). (adapté de *LeSage et al., 1999*).

1.1.2. Ratio progressif

Dans les programmes de renforcement en PR, le nombre de réponses requis pour obtenir des injections successives augmente progressivement, selon un algorithme déterminé, jusqu'à ce que l'animal arrête de répondre (*Richardson and Roberts, 1996*). Il est classiquement considéré que le nombre d'appuis nécessaires à la délivrance de la dernière injection reçue avant la cessation des réponses (point de rupture) est un indice de l'effort consenti pour obtenir la drogue et reflète la motivation de l'animal pour obtenir la drogue.

L'algorithme utilisé dans le PR diffère selon les laboratoires. Dans des travaux pionniers, effectués afin de déterminer les effets renforçants du lait chez le rat, une série arithmétique avec un accroissement de deux (2, 4, 6, 8, 10, 12...) a été utilisée (*Hodos, 1961*). Dans d'autres protocoles, l'incrémentation se fait par un doublement du ratio entre chaque

injection (2, 4, 8, 16, 32, 64, 128... ; *Hoffmeister, 1979*) ou encore (10, 20, 40, 80, 160, 320... ; *Griffiths et al., 1978*). D'autres laboratoires utilisent des incréments plus aléatoires (30, 60, 90, 150, 210, 270, 390, 510, 630, 870, 1110, 1350, 1830, 2310, 2790, 3750 ; *Risner and Silcox, 1981*). L'inconvénient d'une incrémentation trop lente est qu'il faut des sessions très longues pour déterminer le point de rupture. Les rats s'administrent beaucoup d'injections de drogue, ce qui peut perturber leur comportement ou leur motivation. A l'inverse, l'inconvénient majeur d'une incrémentation trop rapide est que les animaux arrêtent de s'injecter la drogue après seulement 10 ou 12 infusions. Il est alors difficile de constater des différences entre les groupes expérimentaux. Pour palier à ces inconvénients, de nombreuses études sont faites en utilisant un accroissement exponentiel du ratio, dont l'avantage est de conjuguer un accroissement assez lent pour les premières injections et un accroissement plus ample du ratio à partir de la 15^{ème} injection (*Richardson and Roberts, 1996*).

Dans ce même protocole de PR, il existe 2 manières différentes d'augmenter le ratio, soit immédiatement après l'injection de la drogue (*Hodos, 1961; Bedford et al., 1978*), soit au début de chaque nouvelle session (*Griffiths et al., 1978; Risner and Silcox, 1981*). Incrémenter le ratio lors de chaque nouvelle session présente l'avantage que les injections précédentes ne « contaminent » pas le comportement de l'animal. Par contre cela requiert de nombreuses sessions pour déterminer le point de rupture des rats. Au contraire, bien qu'il faille plusieurs sessions de PR pour que les animaux présentent un point de rupture stable (*Depoortere et al., 1993*), il est possible de déterminer ce point à la fin d'une session donnée si l'incrémentation est faite après chaque injection. C'est essentiellement pour cette raison que nous avons opté pour un protocole de PR avec une hausse du ratio après chaque injection.

En PR, la courbe dose-réponse pour la cocaïne est linéaire ; il est plus aisé de conclure quant aux effets d'une intervention comportementale ou pharmacologique sur les propriétés motivationnelles de la drogue. Ainsi une augmentation du point de rupture signifie une hausse de la motivation alors qu'une baisse du point de rupture signifie une diminution (*Richardson and Roberts, 1996*).

1.1.3. HDACi

Nous avons testé l'effet de différents HDACi, à savoir la TsA, la dépuéricine et le PhB sur ces deux protocoles d'AA. Les trois HDACi sont des inhibiteurs généraux des HDAC, dans la mesure où ils ne possèdent aucune spécificité particulière vis-à-vis de l'une ou l'autre des HDAC des classes I, II et IV (*Marks et al., 2001*). Nous en avons utilisé plusieurs afin de

conforter nos résultats. De par leurs structures, ces trois inhibiteurs appartiennent à trois classes distinctes d'HDACi. La TsA est un acide hydroxamique présentant *in vitro* une IC₅₀ de l'ordre du µM et le PhB est un acide gras à courte chaîne aliphatique ayant *in vitro* une IC₅₀ de l'ordre du mM. Ils passent tous deux la barrière hématoencéphalique, raison pour laquelle ils ont été injecté en i.v. Puisque cela n'est pas le cas de la dépodécine, celle-ci a été injectée dans les ventricules cérébraux. C'est un HDACi de la classe des époxydes présentant *in vitro* une IC₅₀ de l'ordre du µM (de Ruijter et al., 2003). Aucune donnée n'était disponible concernant les doses de TsA et de PhB à injecter en i.v.

1.2. Modification du comportement des rats par les HDACi

1.2.1. Concernant l'AA de cocaïne

Concernant l'effet des HDACi sur l'AA de cocaïne, les résultats que nous avons obtenus montrent que les rats s'injectent moins de drogue dans un protocole de FR1 après qu'ils aient été traités en i.v. par différentes doses de TsA ou de PhB. De façon intéressante, une différence significative du comportement des animaux n'est observable qu'à partir de la 3^{ème}, voire de la 7^{ème} session d'AA pour, respectivement, la forte et la faible dose de TsA. Cette cinétique indique que les effets ne résultent pas simplement de l'inhibition des HDAC, mais que des effets à long terme, nécessitant sans doute des modifications d'expression de protéines, sont requis pour que la modification s'installe.

Comme décrit plus haut, plusieurs doses de drogue sont nécessaires pour conclure quant à l'effet de la TsA. Ainsi, pour une dose plus élevée de drogue (0,75 mg/kg/infusion), le traitement par la TsA augmente le nombre d'injections faites par les rats ; la différence significative du comportement des animaux n'étant observable qu'à partir de la 4^{ème} session, à savoir un jour plus tard que dans le cas de la faible dose de cocaïne. Ces résultats indiquent que le traitement décale la courbe dose-réponse vers la droite. Si nous nous référons à la théorie développée plus haut (LeSage et al., 1999), ce décalage signifie que la TsA diminue les propriétés renforçantes de la cocaïne.

En PR, les rats s'injectent moins de cocaïne (0,33 mg/kg/injection) après avoir été traités par la TsA i.v. ou par la dépodécine i.c.v. Dans ces expériences, les rats étaient passés par des sessions de FR1 avant d'effectuer les sessions de PR. Puisque le traitement par la TsA en FR1 diminue le nombre d'injections de cocaïne, donc la quantité de drogue injectée par l'animal, il fallait s'assurer que cette différence d'exposition à la cocaïne n'expliquait pas les différences observées en PR. On note que chez des rats ayant effectué sept sessions de FR1

sans traitement préalable, l'injection de TsA à partir de la 1^{ère} session de PR n'a pas d'effet ; par contre une différence significative apparaît après trois sessions de PR. Cela montre que ce n'est pas la différence d'exposition à la cocaïne, pendant les sessions de FR1, qui est à l'origine des effets obtenus en PR. Si nous nous basons sur l'ensemble de nos résultats, les HDACi diminuent clairement les propriétés appétitives de la cocaïne et la motivation des rats à se l'administrer.

Dans une étude très récente, il a été démontré que l'injection directement dans le NAcS de TsA ou de SAHA, un autre HDACi de la classe des acides hydroxamiques, augmente le nombre d'injections faites en FR5 et augmente le point de rupture atteint dans un protocole de PR (Wang *et al.*, 2009). Le fait, que dans cette étude l'inhibition des HDAC augmente les propriétés renforçantes ainsi que la motivation des animaux pour la cocaïne, s'explique sans doute par les différences de conditions expérimentales entre leur étude et la notre. En premier lieu, il faut noter que leur objectif était de tester l'effet des HDACi lors de la phase chronique de consommation de drogue, alors que notre objectif était de tester l'effet de cette inhibition sur la phase d'acquisition du comportement d'AA. En effet, leur traitement n'a débuté qu'après trois à quatre semaines d'AA de cocaïne, alors que nous avons traité nos animaux avant même la 1^{ère} session de FR1, quand les rats étaient naïfs vis-à-vis de la drogue. Un autre point important est le fait qu'ils ont injecté les deux HDACi directement dans le NAcS et non pas en périphérie comme ce fut le cas dans notre protocole. Le fait de cibler spécifiquement ces régions peut expliquer la différence observée sur le comportement de consommation de cocaïne des rats. Dans notre étude, nous avons vérifié que l'inhibition des HDAC était comparable dans l'ensemble du cerveau des animaux, au vu des résultats des mesures de l'activité HDAC réalisées dans le CPF, le CPu, le NAc, l'amygdale, le cervelet et l'hippocampe. Le fait d'inhiber les HDAC dans d'autres régions du cerveau en plus du NAc, et plus particulièrement le CPF ou la VTA peut avoir d'importantes répercussions sur le comportement des animaux.

1.2.2. Inhibition par la TsA de l'activité HDAC chez les rats s'auto-administrant de la drogue

Afin de montrer que nos résultats n'étaient pas biaisés, nous avons effectué un ensemble d'expériences contrôles. Dans un premier temps, nous avons confirmé que les rats traités par la TsA, donc s'auto-administrant moins de cocaïne, présentent bien une diminution de l'activité globale des HDAC dans différentes structures cérébrales. Cette diminution de

l'activité HDAC a été observée 30 min après la 4^{ème} injection de TsA, donc au moment précis où les rats auraient effectués une 4^{ème} session d'AA en FR1 en présentant un comportement d'AA réduit. Ce résultat montre d'abord que le fait d'injecter la TsA plusieurs jours de suite n'affecte pas sa capacité à inhiber les HDAC et qu'il n'existe pas de désensibilisation des HDAC.

1.2.3. Réversibilité de l'effet de la TsA

Nous avons cherché également si l'effet des HDACi perdurait à l'arrêt du traitement. Chez des animaux traités pendant quatre jours par la TsA i.v. et présentant une diminution significative du nombre d'injections, l'arrêt du traitement s'accompagne d'un retour à un niveau basal après quatre jours d'AA supplémentaire. On peut remarquer que le temps mis pour revenir à l'état basal est similaire au temps mis par l'effet à s'installer.

1.2.4. Les HDACi ne modifient pas l'AA de saccharose

Nous avons recherché si les HDACi étaient capables de modifier l'AA d'un renforçant naturel. Nous avons tout d'abord vérifié que la TsA n'avait pas d'effet dans le test de préférence à l'eau sucrée, indiquant que la TsA ne modifie en rien les propriétés hédoniques du saccharose. Ce résultat a depuis été confirmé avec d'autres HDACi, le SAHA ou le MS-275. Ces composés n'ont pas modifié la préférence au saccharose mesurée chez la souris (*Covington et al., 2009*). Concernant l'AA, nous avons reproduit les mêmes protocoles de FR1 et de PR qu'avec la cocaïne, mais de telle sorte que les nose-pokes soient renforcés par de la boisson sucrée. Nous avons constaté que les rats témoins présentent un comportement stable en FR1 et que la TsA n'affecte en rien ce comportement. En PR, la TsA ne diminue pas le point de rupture. Il faut noter que chez les animaux témoins, le point de rupture atteint pour une solution de saccharose 10% avoisine les 20 (soit environ 1400 NP sur tout une session), alors que celui pour la cocaïne à 0,33 mg/kg/injection était d'environ 25 (soit environ 4000 NP sur tout une session), ce qui montre que dans ces conditions la cocaïne possède des propriétés motivationnelles beaucoup plus importantes que le saccharose.

Une seule étude a confirmé que l'acide butyrique n'a pas d'effet sur le nombre d'injections de saccharose faites par des souris présentant un comportement stable d'AA de saccharose en FR1 ou en FR5 (*Sun et al., 2008*). Le fait que la TsA influence l'AA de cocaïne, mais pas celle de saccharose, suggère que le mode d'action de la drogue diffère de celui d'un renforçant naturel et que les régulations épigénétiques ne sont pas impliquées de la

même manière dans l'AA de renforçants naturels. Bien que la consommation de saccharose induise la libération de DA dans le NAc (*Hajnal and Norgren, 2001*), comme la cocaïne (*Di Chiara and Imperato, 1988*), il est raisonnable de supposer que l'AA de ces deux composés agisse sur le circuit de récompense de manière distincte et que seules les effets induits par les renforçants non naturels sont sous la dépendance de mécanismes épigénétiques dépendants des HDAC (*Levine et al., 2003*).

1.2.5. Drogue et renforçants naturels n'ont pas les mêmes effets sur l'activité HDAC

Nous avons vérifié que l'injection de TsA diminue l'activité HDAC chez des rats s'auto-administrant de la cocaïne. Nous nous sommes demandés si l'AA de cocaïne pouvait par elle-même modifier l'activité HDAC dans certaines structures cérébrales. De nos mesures, il ressort qu'après dix sessions de FR1 de cocaïne ou de saccharose, l'activité enzymatique est altérée. Ainsi, l'AA de cocaïne diminue l'activité HDAC dans le CPF et le NAc, mais la stimule dans l'hippocampe. Par contre l'AA de saccharose la diminue dans le NAc, le CPU et l'amygdale. Il faut donc en conclure que l'AA de ces deux composés modifie de façon très distincte l'activité HDAC dans le cerveau. Puisque les différentes HDAC ne sont sans doute pas exprimées à des niveaux équivalents dans le cerveau (*Broide et al., 2007*) et que l'on suppose que la cocaïne et le saccharose ont des cibles distinctes, on peut aisément comprendre les résultats que nous avons observés. L'argument déjà avancé que les AA de cocaïne et de saccharose n'agissent pas de la même manière sur le circuit de récompense pourrait expliquer les différences obtenues.

Une seule étude a pour l'instant montré des effets d'une drogue sur l'activité HDAC : une injection unique d'éthanol diminue significativement cette activité dans l'amygdale de rat, un effet très similaire à celui obtenu chez nos animaux quand ils s'auto-administrent du saccharose pendant dix jours (*Pandey et al., 2008*). Puisque la cocaïne et l'éthanol n'affectent pas directement l'activité des HDAC, on peut supposer que les modifications que nous mesurons résultent de changements d'activités liées à une néosynthèse de HDAC, donc de la transcription de celles-ci.

1.2.6. Perturbation de la sensibilisation locomotrice par les HDACi

Un décalage de la courbe dose-réponse vers la droite pouvant aussi signifier une diminution générale des capacités locomotrices des animaux, nous avons vérifié que l'injection de TsA à

des rats ne perturbe en rien le comportement locomoteur ainsi que leur activité exploratoire dans un nouvel environnement. Il est connu que les psychostimulants induisent une hyperlocomotion, qui s'accroît avec la répétition du traitement pour finalement produire des comportements stéréotypés. Ces changements progressifs à la fois d'ordre quantitatif et qualitatif sont connus sous le nom de «sensibilisation comportementale». On distingue deux phases dans le développement de cette sensibilisation comportementale : l'induction et l'expression. La phase d'induction renvoie à une séquence d'événements qui conduit aux modifications du fonctionnement cérébral responsables du changement dans la réponse comportementale. La phase d'expression correspond aux altérations neurales issues de la phase d'induction qui sous-tendent directement l'augmentation de l'effet comportemental. Ces deux processus sont non seulement temporellement, mais aussi anatomiquement et biochimiquement distincts. Ainsi, la sensibilisation comportementale peut être considérée comme un modèle animal de vulnérabilité acquise, en partie sous la dépendance de facteurs génétiques, mais dont le déterminisme biologique dépend du stade de développement (Azorin *et al.*, 2004). Dans notre étude, il s'avère que la TsA n'altère pas l'hyperlocomotion induite par une injection unique de cocaïne, mais qu'elle bloque l'induction de la sensibilisation comportementale sur cinq jours. La réactivation de cette sensibilisation, mesurée après six jours sans drogue, est bloquée également par la TsA.

Ces résultats vont dans le même sens que ceux montrant que l'injection d'acide valproïque directement dans le NAcC n'a pas d'effet sur la locomotion des rats, mais bloque, en fonction de la dose, la mise en place de l'hyperlocomotion induite par une injection d'amphétamine (Kim *et al.*, 2008b). De même, l'acide valproïque n'a pas d'effet sur l'hyperlocomotion induite par la morphine chez la souris mais bloque la sensibilisation comportementale induite par cette drogue (Li *et al.*, 2004). Par contre nos résultats vont à l'encontre d'études qui veulent que les HDACi potentialisent plutôt la sensibilisation comportementale. Une étude de 2007 rapporte que l'acide valproïque et l'acide butyrique n'ont pas d'effet sur l'hyperlocomotion induite chez des souris par l'amphétamine, mais potentialisent la sensibilisation comportementale après cinq et huit jours de traitement (Kalda *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2008). Chez des rats traités pendant deux jours par la cocaïne, l'acide butyrique augmente l'activité locomotrice le second jour, mais pas le premier (Kumar *et al.*, 2005). Enfin, selon une étude très récente faite chez la souris, l'acide butyrique potentialise la sensibilisation comportementale induite par la cocaïne, l'éthanol et la morphine. L'expression de la sensibilisation, induite par ces trois composés, est augmentée par un traitement à l'acide butyrique (Sanchis-Segura *et al.*, 2009).

Au vu de l'ensemble de ces résultats, il est évident que les HDACi n'ont pas d'effet sur la locomotion basale des animaux en absence de drogue. Par contre, leurs effets sur l'hyperlocomotion induite par les drogues, sur l'induction de la sensibilisation comportementale ou encore sur l'expression de cette dernière restent pour le moment à préciser.

1.2.7. Blocage de la rechute aux drogues par les HDACi

Sur le plan clinique, le principal obstacle du traitement de la dépendance est le risque permanent de rechute, même après de très longues périodes de sevrage. Nous avons réussi à démontrer que la TsA et le PhB diminuent l'amplitude de la rechute. Ce comportement de recherche de cocaïne a été induit après dix jours d'AA de cocaïne en FR1, suivis de trois semaines de sevrage, par la combinaison d'une injection de cocaïne et d'une réexposition des animaux à un stimulus préalablement associé à la prise de la drogue. Dans cette expérience, les HDACi ont été injectés pendant cinq jours de suite, sans que ces injections soient suivies d'une mise en contact avec la drogue. L'inhibition prolongée des HDAC pendant la période de sevrage semble suffisante pour induire un remodelage de la chromatine, qui serait à l'origine de la différence de comportement observé. Bien qu'aucune autre donnée ne soit disponible concernant l'AA de drogue, nos résultats vont dans le même sens que ceux obtenus dans des études concernant les effets de certains HDACi sur l'extinction et la réactivation de la CPP à la cocaïne. Ainsi l'acide butyrique diminue l'amplitude de la réinstallation d'une CPP induite par la cocaïne après quatre jours de conditionnement et huit jours d'extinction (*Malvaez et al., 2010*). La similarité des résultats obtenus dans deux paradigmes distincts (AA de drogue et CPP) indique que les neuroadaptations se mettant en place pendant le sevrage à l'origine du « craving » sont sous le contrôle de mécanismes épigénétiques et plus particulièrement de l'acétylation des histones.

1.3. Conclusions et perspectives

Nos résultats montrent clairement que des mécanismes épigénétiques, plus particulièrement la désacétylation des histones, sont impliqués dans les effets à long terme de la cocaïne. Les propriétés renforçantes et motivationnelles de cette drogue sont diminuées par les divers HDACi généraux que nous avons utilisés, sans affecter l'AA d'un renforçant naturel. Afin de déterminer quelle(s) HDAC particulière est (sont) impliquée(s) dans ces mécanismes, il serait intéressant de tester l'effet d'HDACi plus spécifiques : sont apparus récemment la

spiruchostatin A (Crabb *et al.*, 2008) qui inhibe sélectivement les HDAC de la classe I, ou le MC1568, connu pour inhiber surtout les HDAC II (Nebbio *et al.*, 2009). L'utilisation d'HDACi plus spécifiques est susceptible d'apporter aussi des informations précieuses quant au rôle respectif des HDAC dans les différentes phases de la sensibilisation comportementale. Il serait intéressant aussi de tester les effets des HDACi dans un protocole dans lequel les animaux ont accès à la drogue plus longtemps. Par exemple, chez des rats s'auto-administrant de la drogue pendant 6 h, il est avéré que la consommation de cocaïne augmente au fur et à mesure des sessions, alors que chez des rats ne s'auto-administrant que pendant 1 ou 2 h, une telle escalade de la consommation n'a pas lieu (Ahmed and Koob, 1999). Wang et ses collègues ayant montré que l'inhibition des HDAC dans le NAcS, mais pas dans le NAcC, potentialise l'AA de cocaïne, il serait intéressant de rechercher l'effet d'HDACi injectés dans une autre structure clé du circuit de récompense, le CPF (Wang *et al.*, 2009).

L'inhibition des HDAC s'avère bloquer la rechute induite après une période de sevrage de trois semaines, par la combinaison d'une injection de cocaïne et d'une réexposition des animaux à un stimulus préalablement associé à la drogue. Il serait intéressant de dissocier les deux facteurs de rechute et de rechercher l'effet des HDACi sur chacun d'eux. Il conviendrait de tester aussi l'effet des HDACi sur la rechute induite par le stress. Cela devrait apporter un éclairage sur quelle(s) composante(s) de la rechute est (sont) sous le contrôle de mécanismes épigénétiques.

Au vu de nos résultats, il conviendrait de déterminer la nature des HDAC dont l'activité est modifiée par les drogues. Notons que des kits commerciaux sont actuellement disponibles pour mesurer l'activité des HDAC de la classe I ou celle de la classe IIa. De plus, il serait attrayant de comparer l'effet de diverses drogues toxicomanogènes sur ces activités dans différentes structures cérébrales. Enfin, la modification de l'activité HDAC pouvant résulter de la néosynthèse, il faudrait suivre l'expression des gènes de certaines HDAC suite à la consommation de drogue ou de saccharose, par RT-qPCR ou par immunohistochimie. C'est la démarche que nous avons suivie en entreprenant l'étude de l'expression de certaines HDAC (« Discussion » ; chapitre 3).

Le principal obstacle dans le traitement de la toxicomanie est le risque permanent de rechute. Or, d'après nos résultats, l'inhibition des HDACi diminue ce risque chez les animaux. Etant donné que de nombreux HDACi sont actuellement en phase clinique, essentiellement pour leurs potentiels anticancéreux (« Contexte Scientifique » ; Tableau 8 p 70-71), il serait très intéressant de conduire des essais cliniques avec certains de ces HDACi auprès de personnes désireuses de stopper leur consommation de drogue.

2. Effet de l'inhibition des HDAC sur la CPP à la nicotine

2.1. Justification du protocole utilisé

Parallèlement aux études visant à élucider le rôle des HDAC dans l'AA de cocaïne, nous avons eu la possibilité de rechercher l'effet de l'inhibition des HDAC sur la CPP induite par la nicotine. Pour ce faire, nous avons eu recours à un dispositif et à une procédure volontairement biaisés. Lors de la phase de préconditionnement, le temps passé par le rat dans chacun des deux compartiments d'une cage permet de déterminer une éventuelle préférence de place spontanée. Bien que dans cette étape les rats soient supposés passer environ 50% du temps dans chacun des compartiments, il arrive qu'ils montrent une préférence pour un compartiment donné, généralement le plus sombre. Le dispositif est donc biaisé.

Dans notre procédure, l'injection de nicotine a été associée systématiquement au compartiment initialement non préféré des rats. Le choix de cette procédure biaisée découle du fait que si la nicotine est injectée aux rats dans le compartiment initialement préféré, il sera difficile de mettre en évidence une CPP significative (*Calcagnetti and Schechter, 1994; Le Foll and Goldberg, 2005*). De même, pour induire une CPA, la forte dose de nicotine a été associée au compartiment préféré des animaux lors du préconditionnement.

2.2. Diminution des propriétés récompensantes de la nicotine par les HDACi

Il s'est avéré que le PhB abolit l'acquisition de la CPP induite par quatre jours de conditionnement à la nicotine. Par contre la CPA, induite par une dose élevée de nicotine, n'est pas sensible à l'inhibition des HDAC. Ceci suggère que les mécanismes neuronaux induits par la CPP et la CPA sont très différents. Ces résultats sont en accord avec une étude récente montrant que l'acide butyrique facilite l'extinction de la CPP induite par la cocaïne après quatre jours de conditionnement. Il diminue aussi l'amplitude de la réinstallation de cette CPP après huit jours d'extinction (*Malvaez et al., 2010*). Ce résultat est en faveur de l'hypothèse selon laquelle l'inhibition des HDAC facilite l'apprentissage. Par contre, cette même équipe a montré que l'acide butyrique, injecté avant chacune des trois sessions de conditionnement, potentialise la CPP à la morphine (*Sanchis-Segura et al., 2009*) alors qu'il avait déjà été démontré que l'acide valproïque inhibe la CPP induite par la morphine chez la souris (*Mu and Yu, 2007*). Une autre équipe a montré, d'une part que l'injection i.p. de TSA à des souris potentialise la CPP à la cocaïne, d'autre part que la surexpression de HDAC4 ou de HDAC5 directement dans le NAc diminue l'amplitude de cette même CPP (*Kumar et al.,*

2005; *Renthal et al., 2007*). De façon surprenante, cette même équipe a noté que chez des souris dont les gènes *HDAC5* ou *HDAC9* ont été invalidés, la CPP à la cocaïne n'est pas perturbée, ce qui suggère la mise en place de mécanismes compensatoires ou d'une redondance entre les HDAC de la classe IIa dans ces mécanismes particuliers (*Renthal et al., 2007*). Bien que certains résultats soient encore contradictoires, il faut admettre que l'inhibition des HDAC, donc le remodelage de la chromatine qui en résulte, modifie les propriétés de récompense et les effets appétitifs des drogues nicotines, morphine et cocaïne.

2.3. Conclusions et perspectives

Il convient d'abord de répéter ces expériences de CPP en utilisant d'autres HDACi appartenant à d'autres classes d'inhibiteurs, comme nous avons procédé dans le cas de l'AA de cocaïne. Dans nos études, le PhB diminue la CPP induite par la nicotine sans affecter la CPA. Etant donné que dans d'autres études l'injection *in situ* d'HDACi potentialise la CPP à la morphine ou à la cocaïne, il serait intéressant de procéder à une étude transversale pour établir définitivement qu'avec un protocole donné effectué dans un seul laboratoire, les HDACi diminuent réellement les effets appétitifs de la nicotine tout en augmentant ceux de la morphine ou de la cocaïne. Alors seulement nous pourrions conclure que l'appétence de nombreuses drogues est sous le contrôle de mécanismes épigénétiques, mais que chaque drogue utilise ces mécanismes de façon particulière. Ici aussi, tester des HDACi plus spécifiques de l'une ou l'autre sous-classe apporterait sans doute des précisions.

3. Effet des drogues et des HDACi sur l'expression génique

Nous nous sommes alors demandé si l'AA de cocaïne pouvait modifier l'expression d'une ou plusieurs HDAC et ainsi expliquer les variations d'activités HDAC mesurées dans les différentes structures cérébrales.

3.1. AA de cocaïne et expression génique

Dans notre recherche sur les effets de l'AA de cocaïne sur l'expression de facteurs épigénétiques, nous nous sommes focalisés sur l'expression du facteur de liaison à l'ADN méthylé MeCP2, ainsi qu'aux HDAC 2, 5 et 11. Le choix de ces quatre cibles est justifié car :

- MeCP2 est induit au niveau de CPF et du CPU de rats injectés i.p. par de la cocaïne pendant dix jours (*Cassel et al., 2006*).
- HDAC2 est également induit dans les mêmes conditions (*Cassel et al., 2006*).
- HDAC5 est la représentante majeure de la classe IIa au niveau du striatum ; son implication dans la CPP induite par la cocaïne avait déjà été montrée (*Renthal et al., 2007*).
- HDAC11 est la seule et unique représentante de la classe IV et est très exprimée dans le tissu nerveux (*Broide et al., 2007*).
- Aucune HDAC de la classe IIb (HDAC6 et 10) n'a été étudiée, car elles sont très peu exprimées dans l'encéphale. De plus, leurs substrats étant essentiellement cytoplasmiques, leur analyse ne rentrait pas dans le cadre de l'étude des mécanismes de régulation épigénétique de l'expression de gènes.

3.1.1. Cocaïne et FR1

L'AA de cocaïne s'est avérée augmenter l'expression du gène *MeCP2* dans le CgCx, le CPU et les deux sous-régions du NAc. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus dans l'étude citée plus haut (*Cassel et al., 2006*). L'AA de drogue augmente aussi l'expression du gène *HDAC2*, plus précisément le pourcentage de cellules immunomarquées, dans les mêmes structures, en accord avec notre étude antérieure (*Cassel et al., 2006*), qui indiquait que l'injection i.p. de cocaïne pendant dix jours augmentait l'intensité de marquage de HDAC2. L'AA de cocaïne augmente l'expression de la protéine HDAC11 dans les structures cérébrales citées. Ce résultat est le premier montrant l'implication de cette HDAC de classe IV dans les mécanismes épigénétiques induits par la cocaïne. Finalement, l'expression du gène *HDAC5* n'est pas modifiée avec l'AA de cocaïne, mais cette drogue induit une

accumulation de la forme phosphorylée de la protéine hors du noyau cellulaire dans l'ensemble des quatre structures étudiées. Ce résultat confirme des travaux publiés en 2007 qui suggéraient que l'injection i.p. de cocaïne à des rats induisait une hausse de la phosphorylation de HDAC5 accompagnée de l'accumulation de la forme phosphorylée de HDAC5 dans le cytoplasme de neurone du NAc (*Renthal et al., 2007*). Puisque l'activité du facteur de transcription MEF2C est inhibée par HDAC5 dans le noyau (*Grozinger and Schreiber, 2000*), l'AA de cocaïne, en favorisant la sortie de HDAC5 hors de ce compartiment cellulaire, permet l'activation transcriptionnelle de MEF2C. Ce type de mécanisme avait été décrit lors de la différenciation musculaire (*McKinsey et al., 2000*). De plus, nous savons que l'injection répétée de cocaïne i.p. à des rats augmente dans le NAc le niveau de phosphorylation des facteurs de transcription apparentés à MEF2C, à savoir MEF2A et MEF2D (*Pulipparacharuvil et al., 2008*). Les sirtuines, les HDAC de la classe III, semblent aussi être impliquées dans les effets de la cocaïne. En effet, l'injection répétée de cocaïne induit l'expression de SIRT1 et SIRT2 dans le NAc. De plus, l'injection de l'activateur resvératrol à des souris potentialise la CPP, alors que l'injection de l'inhibiteur sirtinol la diminue. Enfin, l'injection de sirtinol directement dans le NAc décale vers le bas la courbe dose-réponse de l'AA de cocaïne chez le rat, suggérant que l'inhibition des sirtuines diminue les propriétés renforçantes de la drogue (*Renthal et al., 2009*).

3.1.2. Corrélacion entre expression des HDAC et activité HDAC

Si nous nous référons aux résultats obtenus concernant l'activité HDAC mesurée dans le CPF, le CPu et le NAc, il est impossible de trouver une corrélation entre les activités HDAC mesurées après dix jours d'AA de cocaïne et les modifications d'expression des HDAC rapportées après quatre jours de FR1. En effet l'AA de drogue diminue l'activité HDAC globale dans le CPF et le NAc, alors que les HDAC2 et 11 sont surexprimées dans ces deux structures. De même, ces deux HDAC sont surexprimées dans le CPu, alors que l'AA ne modifie pas l'activité HDAC dans cette région cérébrale. Bien sûr, ces différences peuvent tout simplement être dues au fait que dans un cas les rats ont effectué quatre jours de FR1 et dans l'autre dix.

3.1.3. Inhibition des HDAC et expression des facteurs de régulation épigénétique de la transcription

Nous avons analysé l'effet du traitement par la TsA, sur l'expression des gènes cités, chez ces rats ayant effectué quatre jours d'AA. La TsA, injectée i.v. 30 min avant les sessions de FR1, diminue l'expression du gène et de la protéine MeCP2 dans le CgCx, le CPU et le NAc, mais n'a pas d'effet sur l'expression de HDAC2. Nos résultats sont en accord avec des travaux qui ont montré que l'acide butyrique, l'acide valproïque, le MS-275 et la TsA diminuent l'expression de MeCP2 *in vitro* (Daly and Shirazi-Beechey, 2006; Kundakovic et al., 2009). A l'inverse, d'autres travaux suggèrent que, *in vitro* toujours, l'acide valproïque augmente l'expression de MeCP2 après sept jours de traitement (Kim et al., 2008a). A première vue, il est surprenant de constater que la TsA diminue l'expression d'un gène, alors que la vision générale du fonctionnement des HDAC veut que l'hyperacétylation des histones soit associée à l'augmentation de la transcription (Yang and Seto, 2008). Ce point est discuté plus loin (« Discussion » ; chapitre 3.3.1).

D'après nos résultats, le traitement des rats par la TsA n'a pas d'effet sur la localisation subcellulaire de HDAC5 dans le cortex et le striatum. Ceci est corroboré par l'absence d'effet sur l'expression du facteur de transcription MEF2C dans le CgCx et le CPU. Par contre, il est surprenant de constater que dans le NAc, l'expression de MEF2C est fortement réduite par la TsA, alors que la localisation subcellulaire de phospho-HDAC5 n'est pas modifiée. Ce dernier résultat suggère que dans le NAc, la régulation de MEF2C est différente en comparaison avec d'autres structures cérébrales. Il faut considérer qu'*in vitro* au moins, MEF2C peut être inhibé par d'autres membres de la classe II des HDAC, selon un mécanisme similaire à HDAC5, à savoir un transfert entre le compartiment nucléaire et le cytoplasme dépendant de l'état de phosphorylation. Ainsi l'expression de MEF2C est inhibée par HDAC4 ou HDAC7 (Kao et al., 2001; Karamboulas et al., 2006). Dans cette étude, l'inactivation de MEF2A et MEF2D, directement dans le NAc chez des souris, n'agit pas sur l'hyperlocomotion induite par la cocaïne, mais diminue l'amplitude de la sensibilisation comportementale et diminue l'expression de cette sensibilisation (Pulipparacharuvil et al., 2008). Ce résultat est plutôt en accord avec les nôtres décrivant que l'injection de TsA bloque l'induction et l'expression de la sensibilisation comportementale induite par la cocaïne. Enfin, l'inhibition des HDAC avant les quatre sessions d'AA de cocaïne a pour conséquence de potentialiser fortement l'expression de HDAC11, déjà induite par l'AA de cocaïne.

L'ensemble des résultats montre que l'AA de cocaïne modifie différemment l'expression de certaines HDAC et de deux facteurs de transcription. La cocaïne agit par des mécanismes de régulation épigénétique dépendant eux-mêmes des activités HDAC. Ainsi, les effets de la TsA sur le comportement des rats impliquent sans doute des protéines cibles de MeCP2, MEF2C ou encore HDAC11.

3.2. CPP à la nicotine et expression génique

Lors de notre étude sur les effets de l'inhibition des HDAC sur la CPP induite par la nicotine, nous avons recherché si l'effet sur la transcription de MeCP2 et HDAC2 dans l'AA de cocaïne était transposable à la nicotine.

MeCP2 est effectivement surexprimée au niveau du striatum suite à l'injection de nicotine, indépendamment de la dose. Par contre, la nicotine n'induit pas l'expression de MeCP2 au niveau du CPF, alors que l'AA de cocaïne induit fortement cette protéine dans le CgCx. De même, HDAC2 est surexprimée au niveau du striatum en réponse à la nicotine, mais n'est pas induite au niveau du CPF, contrairement à ce qui a été observé en réponse à la cocaïne. De plus, la CPP mesurée après quatre jours de conditionnement augmente la phosphorylation de CREB dans le CPF, le CPu, les deux sous-régions du NAc et la VTA. Par contre la CPA n'a aucun effet sur la phosphorylation de CREB. L'obtention de ce résultat est en accord avec les travaux de Pascual et ses collègues qui ont montré que la CPP, mais non la CPA, augmente la phosphorylation de CREB (*Pascual et al., 2009*).

Le fait que les deux doses de nicotine (récompensante ou aversive), ainsi que la cocaïne augmentent l'expression de MeCP2 et de HDAC2 suggère que l'effet est une conséquence de l'activation du circuit de récompense et donc des structures cibles. En ce qui concerne les différences observées au niveau des structures corticales, deux raisons au moins peuvent être invoquées pour que la cocaïne, mais pas la nicotine, induise MeCP2 et HDAC2. Puisque les comportements d'AA et de CPP / CPA n'étudient pas exactement les mêmes effets des drogues, les aires corticales ne sont pas impliquées de la même manière. La seconde raison est que la cocaïne et la nicotine, en plus de l'activation du système de récompense provoquant une libération de DA au niveau des régions corticales, présentent des mécanismes d'action supplémentaires différents, ce qui se traduirait par des effets notés exclusivement au niveau du CPF et non pas du striatum.

3.3. Analyse par microarrays des gènes régulés par la TsA chez les rats s'auto-administrant de la cocaïne

La TsA, en décalant la courbe dose-réponse de la cocaïne en FR1 vers la droite, diminue les propriétés renforçantes de cette drogue. L'AA de cocaïne modifie l'expression du facteur de transcription MEF2C dans le CgCx et dans le NAc, alors que la TsA diminue cette expression dans le NAc, mais pas dans le CgCx. Nous avons cherché à caractériser les gènes dont l'expression était modifiée par la TsA, dans le CgCx et dans le NAc, chez des rats s'auto-administrant de la cocaïne en FR1. Au moyen de la technologie dite des microarrays (GeneChip® Rat Genome 230 2.0), nous avons recherché les effets de la TsA sur l'expression de 31000 échantillons.

3.3.1. Régulation d'environ 2% des échantillons par la TsA

Après analyse statistique des résultats bruts, 722 échantillons au niveau du CgCx et 136 échantillons au niveau du NAc ont été identifiés comme étant différemment exprimés chez les rats ayant reçu de la TsA par rapport aux animaux témoins. Ces valeurs représentent 2,3% pour le CgCx et 0,4% pour le NAc de l'ensemble des 31000 échantillons considérés. Ces valeurs faibles peuvent surprendre ; elles sont cependant en accord avec les résultats obtenus essentiellement dans des cellules tumorales (2% ; *Van Lint et al., 1996*; 2% ; *Moreira et al., 2003*). Pour ne citer qu'un exemple, dans des cellules MCF7 en culture, la TsA régule l'expression de 87 gènes sur 20000 environ, ce qui représente à peine 0,4% (*Crabb et al., 2008*). La régulation de l'expression de gènes par acétylation apparaît bien plus sélective que ce qu'on peut attendre de la désorganisation de la structure chromatinienne. Pour expliquer cette relative sélectivité, il faut considérer que pour que l'inhibition des HDAC ait une incidence sur l'expression d'un gène donné, il faut que sa transcription soit activée à un instant donné en réponse à un signal de l'environnement.

Au niveau du CgCx, la TsA augmente l'expression de 692 parmi les 722 échantillons mis en évidence (96%) alors qu'à l'opposé dans le NAc la surexpression ne concerne que 25 des 136 échantillons (18%). On peut considérer que ces résultats sont en accord avec les données de la littérature, montrant que les HDACi répriment, autant qu'ils activent, l'expression des gènes (*Drummond et al., 2005*; *Crabb et al., 2008*). Par exemple, dans des neurones corticaux en culture, l'acide valproïque augmente l'expression de 726 échantillons et diminue l'expression de 577 autres (*Fukuchi et al., 2009*). Selon le modèle conventionnel, les HDAC, en désacétylant les histones, compactent la chromatine inhibant ainsi l'expression

des gènes ; en hyperacétylant les histones, les HDACi augmentent donc l'expression de ces gènes. En plus de leur capacité inhibitrice de l'activité HDAC, les HDACi diminuent, *in vitro*, l'expression des DNMT. Ainsi, l'apidine diminue l'expression de la DNMT1 (You *et al.*, 2008), le depsipeptide diminue l'expression de la DNMT3_A (Wu *et al.*, 2008) et l'acide butyrique, tout comme la TsA, diminuent l'expression de la DNMT3_B (Xiong *et al.*, 2005). Les HDACi abaisseraient donc le niveau de méthylation des gènes, ce qui en règle générale conduit à potentialiser l'expression de ces gènes. Ces considérations ne permettent cependant pas d'expliquer l'inhibition de la transcription causée par divers HDACi (de Ruijter *et al.*, 2005; Daly and Shirazi-Beechey, 2006). A l'heure actuelle, très peu d'hypothèses ont été avancées pour expliquer ce phénomène. Dans une seule étude, la TsA et l'acide butyrique se sont avérés diminuer le niveau d'acétylation des histones H3 et H4 au niveau des promoteurs de nombreux gènes dans des cellules en culture, ce qui a conduit à la répression de ces mêmes gènes (Rada-Iglesias *et al.*, 2007).

3.3.2. Identification des échantillons régulés par la TsA

Une partie seulement des 31000 échantillons, présents sur les puces Affymetrix®, est associée à des gènes identifiés. En effet, les séquences d'oligonucléotides présentes sur les microarrays correspondent à des EST (« expressed sequence tag ») créés à partir de séquences d'ADNc. Or, ces séquences d'ADNc peuvent être issues de séquences génomiques dont la fonction est inconnue à ce jour. Ainsi, les échantillons associés à des gènes identifiés sont au nombre de 313 pour le CgCx et de 48 pour le NAc. On peut noter que parmi ces gènes, certains codent :

- des récepteurs des neurotransmetteurs, tels les sous-unités $\alpha 1$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ ou $\gamma 2$ du récepteur GABA_A ou le récepteur 5HT_{2A}.
- des canaux ioniques, comme les sous-unités $\alpha 2$ et $\beta 4$ du canal calcium dépendant du voltage, le canal sodium dépendant du voltage de type 1 α , ou encore le canal TRPM7 (« transient receptor potential-related protein 7 »).
- des protéines du cytosquelette, telles MAP2 ou Homer1, impliquées dans les mécanismes de plasticité.
- de nombreux représentants des cascades de signalisation intracellulaire, comme des Rho GTPases, la phosphatidyl-inositol-3-kinase ou une sous-unité régulatrice de la protéine phosphatase 4 (PP4R2).

- des protéines possédant un motif en doigt de zinc, impliquées dans la transcription de gènes, comme par exemple le gène à réponse précoce TSC22 (« transforming growth factor- β stimulated clone-22 »).
- des protéines qui, lorsqu'elles sont mutées, sont à l'origine de cas de retards mentaux, comme FMR1, associée au retard mental du X fragile.
- des protéines qui, lorsqu'elles sont mutées ou mal traduites, sont à l'origine de troubles du développement du cerveau, comme la lissencéphalie. C'est le cas de la Reeline et de Lis1 (« Lissencephaly gene-1 ») aussi appelée Pafah1b1.

En comparant les 313 et 48 gènes, obtenus dans chacune des deux structures cérébrales considérées, deux remarques viennent à l'esprit : la première concerne la dichotomie des effets observés entre les deux structures : la quasi-totalité des gènes régulés par la TsA dans le CgCx sont induits, alors que dans le NAc, ils sont réprimés. Cette observation peut paraître étonnante, si l'on considère que les deux structures correspondent à des aires de projection dopaminergiques, activées de manière similaire par la cocaïne. La seconde remarque vient de ce que seuls 12 gènes identifiés sont communs aux deux structures (Tableau 10). Parmi ceux-ci on trouve deux facteurs de transcription, à savoir les deux protéines à doigt de zinc 386 et 597 ; un canal membranaire dépendant du potentiel TRPM7 ; une kinase appartenant à la famille des phosphatidyl-inositol-3-kinases (SMG-1) ou encore deux kinases appartenant à la famille des kinases CDC2 (« cell division control protein 2 homolog ») importante dans la régulation du cycle cellulaire.

Tableau 10 : Liste des gènes modulés par la TsA communs entre le CgCx et le NAc

Référence Affymetrix	Annotation du gène	Effet de la TsA	
		CgCx	NAc
1368712_at	zinc finger protein 386	+	-
1369059_at	transient receptor potential-related protein 7	+	-
1370705_at	zinc finger protein 597	-	-
1372830_at	PI-3-kinase-related kinase SMG-1	+	-
1372923_at	peroxisomal biogenesis factor 11b	-	-
1373534_at	SR rich protein	+	-
1392818_at	growth arrest specific 5	+	-
1394160_at	transmembrane protein 2	-	-
1395523_at	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G	+	-
1398993_at	RNA-binding region containing 2	+	-
1399022_at	CDC-like kinase 1	+	-
1399141_at	CDC-like kinase 4	+	-

+, gène induit ; -, gène réprimé

3.3.3. Validation des microarrays

Nous avons choisi de valider sept gènes uniquement, puisque notre objectif était de montrer que les résultats étaient fiables et non pas de valider le catalogue entier de 361 gènes. Ainsi, nous avons entrepris de valider par RT-qPCR l'expression de cinq gènes induits au niveau du CgCx (*5HT_{2A}*, *FMRI*, *GABA_Aβ2*, *Lis1* et *PP4R2*) et de deux au niveau du NAc, l'un induit (*TSC22*) et l'autre réprimé (*Reeline*). Ces résultats confirment que :

- Les gènes codant la sous-unité β2 du récepteur GABA_A (*GABA_Aβ2*) et le récepteur 2A de la sérotonine (*5HT_{2A}*) sont sous le contrôle de la TsA. Par contre, ils ne sont pas induits lors de la seule AA de cocaïne.
- Le gène codant la sous-unité régulatrice 2 de la protéine phosphatase 4 (*PP4R2*) est régulé pareillement.
- Les gènes codant les protéines Lis1 et FMRI sont induits très fortement dans le CgCx par la TsA chez des rats s'auto-administrant de la cocaïne. Ils sont également induits par l'AA de cocaïne.

- Le gène codant la Reeline est réprimé dans le NAc par la TsA chez les animaux s'injectant de la cocaïne.
- Le gène codant TSC22, caractérisé induit par la TsA par microarrays, est induit par la cocaïne, mais pas par la TsA. C'est le seul résultat discordant entre les deux techniques.

Etant donné nos résultats antérieurs, nous pouvions nous attendre à ce que les résultats de microarrays comprennent les gènes *MeCP2*, *HDAC11* ou d'autres dont nous savons qu'ils sont sous le contrôle de la TsA. Par exemple, nous avons montré par RT-qPCR que la TsA diminue l'expression de *MeCP2* respectivement de 27% et 14% dans le CgCx et le NAc, correspondant à des rapports TsA / contrôle de 0,73 et 0,86. Or, dans les données brutes de génomique, ces rapports pour le gène correspondant à *MeCP2* sont de 0,90 et de 0,92, qui sont en fait des valeurs assez comparables à celles obtenues en RT-qPCR. Ce gène n'apparaît pas significativement modulé par la TsA parce qu'il ne remplit pas l'ensemble des critères de sélection que nous nous étions imposés. Un résultat plus problématique concerne le gène *MEF2C*, trouvé comme étant significativement induit dans le NAc par l'approche génomique (rapport TsA / contrôle de 1,47 ; voir annexe 2) alors qu'il était significativement inhibé par la TsA dans nos expériences précédentes de RT-qPCR (rapport TsA / contrôle de 0,26). Ainsi, la totalité des données obtenues par les microarrays n'est pas confirmée par RT-qPCR même si une large majorité de résultats se recoupent de façon acceptable. Cette technique est à manipuler avec précaution et les résultats des microarrays ne devraient jamais être pris pour définitifs, tant qu'ils ne sont pas confirmés.

3.4. Conclusions et perspectives

L'AA de cocaïne, mais aussi la CPP induite par la nicotine, modifie l'expression de diverses protéines impliquées dans les mécanismes de régulation épigénétique de la transcription de gènes.

Parmi ces protéines, nous avons caractérisé HDAC11 comme un des principaux acteurs. Malheureusement, on dispose de peu d'information quant aux fonctions cellulaires de HDAC11. Puisque son expression est augmentée par l'AA de cocaïne, il conviendrait d'étudier son expression dans divers protocoles d'AA de cocaïne (FR5, suite à un accès long de 6 h), voire d'autres drogues, mais aussi sur la rechute induite par divers paramètres, ou encore dans la sensibilisation comportementale induite par diverses drogues. HDAC11 étant induite par la TsA, il serait intéressant de suivre les répercussions sur le plan comportemental

de la surexpression ou de l'invalidation de son gène soit dans le CgCx, soit dans le NAc, comme cela a été réalisé avec HDAC4 et HDAC5. Ces deux HDAC diminuent respectivement la motivation pour la cocaïne en PR et la CPP induite par la même drogue lorsqu'elles sont surexprimées directement dans le NAc (*Renthal et al., 2007; Wang et al., 2009*).

Que ce soit dans les conditions d'AA de cocaïne ou de CPP induite par la nicotine, les deux drogues induisent l'expression de MeCP2. Cette induction étant sous le contrôle des HDAC, la protéine MeCP2 régule-t-elle l'expression de gènes participant à l'établissement du pouvoir renforçant, ou appétant d'une drogue ? Il conviendrait de vérifier si son expression est altérée chez des rats s'auto-administrant le renforçant naturel qu'est le saccharose, sachant que les HDACi ne perturbent pas ce comportement. On disposerait alors d'une piste permettant de dissocier MeCP2 des HDAC dans la recherche de leurs interventions respectives dans la neurobiologie sous-jacente à l'expression du pouvoir renforçant.

4. Liens entre Lis1, la Reeline et la cocaïne

4.1. Régulation analogue de l'expression de la Reeline et de Lis1 par la TsA

L'injection de TsA pendant quatre jours à des rats n'a pas d'effet sur l'expression des deux protéines Reeline et Lis1. Par contre, l'injection de TsA à des rats s'auto-administrant de la cocaïne induit l'expression de la Reeline et de Lis1 dans le CgCx et l'inhibe dans les deux sous-régions du NAc. L'expression de ces deux protéines semble être régulée de la même manière. Les résultats obtenus au niveau du CgCx pour la Reeline vont dans le même sens que ceux montrant sa diminution dans des cellules tumorales du pancréas, expression qui peut être restaurée en réponse à l'acide valproïque ou le SAHA (*Sato et al., 2006*). Dès 2005, il a été suggéré que le niveau d'expression de la Reeline dépendait de la méthylation de son promoteur (*Noh et al., 2005*). Cette régulation passe par la liaison de MeCP2 au promoteur du gène, ce qui fait du gène *Reeline* une cible de MeCP2 (*Jordan et al., 2007*).

Par contre, les effets obtenus au niveau du NAc sont opposés à ceux obtenus dans le cortex. Bien que nous ne soyons pas en mesure d'expliquer cette observation, il semble plus aisé d'expliquer pourquoi l'expression de la Reeline et celle de Lis1 sont semblables. En effet, des mutations au sein de chacun des deux gènes sont à l'origine d'une lissencéphalie, une malformation du cerveau humain caractérisée par la désorganisation des couches corticales, résultant d'un défaut de migration des neuroblastes (*Barth, 1987; Assadi et al., 2003*). La similarité du phénotype induit par la mutation des deux gènes résulte sans doute du fait que ces deux protéines appartiennent à la même cascade de signalisation. En effet, la Reeline, en se liant à ses récepteurs APOER2 (« apolipoprotein E receptor 2 ») ou VLDLR (« very low density lipoprotein receptor ») active la protéine DAB1 (« disabled homolog 1 ») connue pour interagir directement avec Lis1 (« Résultats » ; Figure 6 de la publication n°5 p160 ; *Tissir and Goffinet, 2003*). Pour appuyer l'hypothèse d'une régulation commune, on peut noter que l'expression de deux autres composantes de cette voie de signalisation, à savoir NCK1 (« non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1 ») et la PI3K (« phosphatidylinositol 3-kinase ») sont également induites par la TsA dans le CgCx chez les rats s'auto-administrant la drogue. Un tel résultat avait été montré dans des cellules tumorales du pancréas, où l'acide valproïque et le SAHA induisent l'expression de la Reeline, mais aussi celle de plusieurs membres de sa voie de signalisation, tels APOER2, VLDLR ou DAB1 (*Sato et al., 2006*).

Grâce à l'étape de validation des microarrays, nous avons noté que l'expression de Lis1 et de la Reeline était également modifiée par l'AA de cocaïne chez les animaux

« contrôles ». En effet, les gènes *Lis1* et *Reeline* sont tous les deux induits dans le NAc après quatre jours d'AA et *Lis1* est également induit dans le CgCx et le CPu. Au niveau de la protéine, les résultats sont identiques vu que *Lis1* est induite dans la CgCx, le CPu, le NAcC et le NacS. et que la *Reeline* est induite dans le CPu, le NAcC et le NAcS. Ceci montre que l'expression de ces deux gènes est sous le contrôle de la cocaïne.

4.2. *Lis1* et drogues

L'AA contingente de cocaïne induit l'expression de *Lis1* dans le CgCx et le striatum. Une injection i.p., non contingente, de cocaïne induit également *Lis1* dans les mêmes structures. L'amplitude de cette augmentation est renforcée en réponse à des injections répétées de la drogue, suggérant que l'induction de *Lis1* est liée à des mécanismes de plasticité induits par la drogue. Ces résultats sont les premiers à montrer que le gène *Lis1* est sous le contrôle de la cocaïne. Nous avons observé que l'injection répétée de fluoxétine, un inhibiteur sélectif de la recapture de 5-HT, induit également l'expression de *Lis1* dans les mêmes structures. Ces résultats indiquent que la composante 5-HT de la cocaïne participe sans doute à l'induction du gène *Lis1*. D'autres gènes ont d'ores et déjà été caractérisés comme étant induits essentiellement par la composante sérotoninergique de la cocaïne. C'est le cas des gènes *egr-1* et *hVH-5* (Humblot et al., 1998; Thiriet et al., 1998) ainsi que des gènes clock (Uz et al., 2005).

A ce jour, aucune donnée n'est disponible concernant l'implication du gène *Lis1* dans les mécanismes de plasticité synaptique induits dans le cerveau adulte. Lors du développement cérébral, la protéine *Lis1* joue un rôle essentiel dans la migration des neuroblastes et dans leur positionnement dans les couches corticales, puisque des mutations dans son gène sont responsables de la lissencéphalie (Reiner et al., 1993). D'autre part, les neurotransmissions DA, 5-HT et NA, donc celles exacerbées par la cocaïne, jouent également un rôle crucial dans le développement cortical (Levitt et al., 1997). Cela suggère que *Lis1* est impliqué dans les perturbations neuro-développementales observées chez les nouveau-nés de mères consommant de la cocaïne. Ces nouveau-nés présentent souvent un cerveau plus petit, un élargissement des ventricules cérébraux, une diminution de l'épaisseur du cortex cérébral et des anomalies diffuses des gyri (Bellini et al., 2000; Derauf et al., 2009).

4.3. Reeline et drogues

L'administration de cocaïne, contingente ou non contingente, induit l'expression de la Reeline dans le striatum. Comme pour Lis1, ce résultat est le premier à montrer que le gène *Reeline* est sous le contrôle de la cocaïne, même si une étude de 2004 a montré, par hybridation *in situ*, qu'une injection de méthamphétamine à des rats diminuait l'expression de l'ARNm de la Reeline dans le cortex frontal, mais pas dans le CPu (*Numachi et al., 2004*). Il est surprenant de constater qu'une injection unique de cocaïne ou de méthamphétamine induise des effets opposés.

Puisque l'injection répétée de fluoxétine n'induit pas l'expression de la Reeline, cette différence ne provient probablement pas de la composante 5-HT de la cocaïne, dont nous savons qu'elle est moins importante pour la méthamphétamine. Une étude, plus récente, suggère également l'implication de la Reeline dans les mécanismes de plasticité cérébrale induits par les amphétamines. Matsuzaki et ses collègues ont étudié l'effet hyperlocomoteur de la méthamphétamine chez les souris Reeler, qui sont dénuées du gène de la Reeline. Ces souris présentent de nombreuses malformations corticales dont une inversion des six laminations et une plus grande dispersion des neurones au sein des couches. Elles présentent néanmoins une activité locomotrice basale normale ; l'injection i.p. de méthamphétamine induit une légère hyperlocomotion (20% de l'hyperlocomotion induite chez les souris non mutées) (*Matsuzaki et al., 2007*). L'ensemble de ces résultats indique que la Reeline serait impliquée dans la régulation du système dopaminergique, donc dans la plasticité synaptique induite par la cocaïne.

4.4. Lis1, Reeline et troubles psychiatriques

Rappelons que lors du développement cérébral, la Reeline et Lis1 jouent un rôle essentiel dans la mise en place de la cytoarchitecture des structures laminées du SNC via le contrôle de la migration et du positionnement des neurones (*Assadi et al., 2003*). Pour tenter d'expliquer comment les deux protéines Lis1 et Reeline se retrouvent impliquées dans les effets renforçants de la cocaïne, il faut d'abord essayer de cerner leurs rôles respectifs dans le cerveau adulte.

La stimulation de Lis1 et de la Reeline en réponse à la cocaïne signifie sans doute que la drogue réenclenche au moment du traitement des mécanismes identiques ou proches de ceux mis en place lors du développement. Ces protéines pourraient être impliquées dans le remodelage des synapses, ou dans la croissance dendritique, deux phénomènes connus pour

être induits par la cocaïne. En effet, après une période de sevrage faisant suite à des injections répétées de cette drogue, on trouve une augmentation du nombre total d'épines dendritiques et de branchements synaptiques dans le CPF et dans le NAc (*Robinson and Kolb, 1999*). En diminuant l'expression de ces deux protéines dans le NAc, la TsA pourrait perturber la mise en place de cette plasticité structurale induite par la cocaïne. A l'inverse, la TsA augmente fortement l'expression des protéines dans le CPF. Cela pourrait au contraire potentialiser le développement de la plasticité dans cette région impliquée dans le contrôle des comportements, dans la prise de décision et dans le raisonnement.

Concernant plus particulièrement la Reeline, il est établi qu'elle joue un rôle dans la modulation de la plasticité cérébrale (*Levenson et al., 2008*). Elle module, par exemple, l'activité des récepteurs NMDA au niveau de l'hippocampe (*Beffert et al., 2005; Sinagra et al., 2005*); elle intervient ainsi dans la modulation des fonctions cognitives comme la mémoire (*Miller and Sweatt, 2007; Levenson et al., 2008*). Sur le plan clinique, la Reeline est clairement impliquée dans l'étiologie de troubles psychiatriques, tels que la schizophrénie et l'autisme. Des études postmortem ont révélé que les patients atteints de schizophrénie avaient la moitié du taux de Reeline dans diverses structures corticales par rapport aux témoins (*Impagnatiello et al., 1998*). Suite à cette observation, les souris Reeler ont même été considérées comme un modèle animal de la schizophrénie (*Fatemi, 2001*). Cette pathologie est associée à un dysfonctionnement du système dopaminergique méso-cortico-limbique, donc du système de récompense (*Batel, 2000*). Il est d'ailleurs bien connu que les patients schizophrènes présentent un risque accru de dépendance, essentiellement vis-à-vis de l'alcool et du tabac (*Batel, 2000*). Ainsi, le fait que la cocaïne modifie l'expression de la Reeline et d'un de ses effecteurs intracellulaires ouvre une nouvelle piste quant à la nature du lien entre les deux pathologies.

4.5. Conclusions et perspectives

Nous venons de suggérer que dans le cerveau adulte, la cocaïne réutiliserait des mécanismes comparables à ceux qui ont servi lors du développement cérébral, pour établir une plasticité synaptique. Afin d'approfondir cette hypothèse, il conviendrait d'abord d'analyser l'expression de Lis1 et de la Reeline, suite à l'injection répétée d'autres drogues, tels les amphétamines, l'héroïne, la nicotine ou l'alcool. La MDMA, plus connue sous le nom d'ecstasy, stimule la neurotransmission 5-HT de façon prépondérante. Considérant nos

résultats des effets dus à la cocaïne et à la fluoxétine, nous nous attendons à ce que la MDMA provoque une très forte synthèse de Lis1 sans affecter la synthèse de la Reeline.

Il serait également intéressant de pouvoir confirmer que d'autres membres de la cascade de signalisation, tels DAB1 et la PI3K, sont régulés par la TsA chez des animaux consommant de la cocaïne. Cela permettrait de donner plus de poids à l'implication de cette voie de signalisation dans la modulation des effets renforçants de la cocaïne.

Afin de tester si les effets des HDACi sur le comportement des rats sont dû à une altération de la plasticité au niveau du CgCx ou du NAc, il serait attrayant de voir si le traitement à la TsA est capable de modifier la morphologie des épines dendritiques ou le nombre de ramifications des dendrites. Grâce à une approche électrophysiologique, nous pourrions aussi étudier si la TsA, en altérant la synthèse de Lis1 et de la Reeline, est capable de modifier la plasticité synaptique induite par la cocaïne dans les deux structures citées.

Ces deux protéines sont-elles impliquées dans la motivation à consommer des drogues ? Pour répondre à cette question, il faudrait voir comment elles sont exprimées dans un protocole de PR. Concernant la Reeline, il serait intéressant de tester les souris Reeler dans un protocole de CPP ou d'AA de drogue. Pour compléter le tableau, il faudrait rechercher les rôles respectifs des deux protéines dans le « craving » et dans la rechute, particulièrement quand cette dernière est induite par les stimuli environnementaux.

5. Conclusion générale

L'ensemble des données discutées ici montre que les arguments se multiplient pour permettre d'affirmer que les effets comportementaux des drogues s'installent en utilisant des mécanismes de régulation épigénétique de la transcription de gènes. L'implication des HDAC, donc de la régulation de l'acétylation des histones, ainsi que des mécanismes de méthylation de l'ADN ont surtout été étudiés. Cependant, de nouvelles pistes apparaissent, impliquant d'autres modifications posttranscriptionnelles des histones, comme la méthylation ou la phosphorylation (*Brami-Cherrier et al., 2005; Maze et al., 2010*).

L'étude de l'implication des mécanismes épigénétiques dans les effets à long terme induits par les drogues n'est sans doute qu'au début de son histoire. De nombreuses pistes suggèrent que la méthylation de l'ADN ou certaines modifications des histones sont responsables de la mise en place de diverses plasticités synaptiques, dont certaines sont sans nul doute à l'origine du développement de la dépendance aux drogues. Il faut souligner que la stabilité de ces modifications en fait un candidat particulièrement crédible pour expliquer des inductions de gènes sur des temps très longs, voire sur la vie entière. Aucune autre régulation transcriptionnelle présentant une demi-vie compatible avec ces phénomènes n'a été décrite à ce jour. Or une des questions, essentielle dans le domaine des addictions, est précisément de comprendre pourquoi des comportements de rechute peuvent se produire après des mois, ou des années d'abstinence.

D. Matériels et Méthodes

1. Animaux et tests comportementaux

Les études présentées dans ce mémoire ont toutes été réalisées avec des rats mâles adultes de la souche Wistar (160-180 g) provenant de l'élevage Janvier (Le Genest-St-Isle, France). La seule exception concerne les expériences de CPP, faites en Argentine, avec des rats mâles adolescents de la souche Sprague-Dawley (100-140 g) provenant de la faculté de Médecine de Buenos Aires. Après leur arrivée au laboratoire, les animaux sont maintenus deux semaines minimum, par cinq dans des cages standard, afin de les acclimater à leur nouvel environnement. Ils ont eu un accès libre à de la nourriture et de l'eau et ont vécu avec un cycle journalier contrôlé (12 h de lumière / 12 h d'obscurité) et inversé (lumières allumées à 7h00 du matin). Après l'opération chirurgicale afin d'implanter le cathéter dans la veine jugulaire, les animaux ont été placés en cages individuelles, mais de sorte qu'un contact auditif, olfactif et visuel reste possible entre eux. Au minimum cinq jours de récupération postopératoire ont alors été accordés aux rats, avant de débiter les tests comportementaux. Ceux-ci ont toujours eu lieu dans le noir, donc pendant la période d'activité des rats. Toutes les procédures impliquant des soins aux animaux ont été faites en accord avec les lois françaises (directive 87848, 1987, Service Vétérinaire de la Santé et de la Protection Animale ; autorisation 67-165 du Dr. Zwiller) et internationales (publication du National Institute of Health 5586-23, 1985).

1.1. Traitements pharmacologiques

Diverses substances pharmacologiques ont été injectées aux rats. La cocaïne (Sigma-Aldrich, MO, Etats-Unis ou Cooper, Melun, France) a été préparée dans du NaCl 0,9% et injectée par voie intraveineuse (i.v. ; 40 µl par injection) : 0,33 mg/kg/injection ou 0,75 mg/kg/injection pour l'AA et 1 mg/kg pour l'activité locomotrice. La nicotine (Calbiochem, CA, Etats-Unis) a été préparée dans du tampon phosphate 10 mM (PBS pour « phosphate buffered saline ») et injectée en sous-cutané (s.c. ; 2 ml/kg) : 0,21 mg/kg pour la CPP ou 2 mg/kg pour la CPA. Concernant les HDACi : la trichostatine A (TsA ; Sigma-Aldrich) a été préparée dans du diméthylsulfoxyde (DMSO ; 10%) et injectée i.v. (1 ml/kg ; 0,03 ou 0,3 mg/kg) ; l'acide phénylbutyrique (PhB ; Fluka, Sigma-Aldrich) a été préparé dans un mélange DMSO 10% et injecté en i.v. (1 ml/kg ; 2, 20 ou 100 mg/kg) ou en intrapéritonéale (i.p. ; 1 ml/kg ; 10 et 100 mg/kg) en fonction du test comportemental ; la dépodécine (Sigma-Aldrich) a été préparée dans du DMSO 10% et injectée en intracérébroventriculaire (i.c.v. ; 10µl de chaque côté ; 20 nmoles).

1.2. Implantation stéréotaxique des guides canules

L'implantation stéréotaxique des guides canules a été faite pour permettre l'injection de la dépuécine, qui est un HDACi ne passant pas la barrière hémato-encéphalique. La pose a été faite suite à la mise en place du cathéter intraveineux afin d'éviter une seconde opération à l'animal, donc une seconde anesthésie générale. Les rats ont été placés dans un cadre stéréotaxique. Les guides canules (diamètre externe : 0,6 mm; longueur : 20 mm) ont été implantés bilatéralement de sorte que les injections puissent être faites au niveau des deux ventricules latéraux. Les coordonnées sont, d'après (*Paxinos and Watson, 1997*) :

- antéro-postérieure : - 1 mm du bregma
- médio-latérale : \pm 1,6 mm
- dorso-ventrale : - 2,5 mm

Les guides canules ont été maintenus de façon permanente à la surface de la boîte crânienne au moyen de vis et de ciment dentaire (Résine *Paladur*®, Heraeus Kulzer, Hanau, Allemagne). Les injections i.c.v. de 10 μ l de dépuécine ou de DMSO 10% ont été réalisées au moyen d'une seringue d'injection Hamilton de 10 μ l, pendant 1 min via une canule d'injection calibrée descendant à une coordonnée ventrale de 1 mm en dehors du guide canule, soit pour l'injection i.c.v. à - 3,5 mm.

1.3. Auto-administration de cocaïne

1.3.1. Construction du cathéter

Le cathéter a consisté en un tube de Silastic (Plastics One, VA, Etats-Unis) de 12 cm de long, 0,3 mm de diamètre interne et 0,63 mm de diamètre externe rattaché à un guide canule de 22 gauges (Plastics One) plié à angle droit et fixé sur un morceau circulaire de maille de *mersilène*® (Ethicon, Johnson and Johnson, PA, Etats-Unis) de 2,5 cm de diamètre grâce à du ciment dentaire (Résine *Paladur*®). Le guide canule a comporté un pas de vis qui a été externalisé au niveau du dos de l'animal afin de pouvoir injecter les différents composés au rat et de pouvoir le fermer hermétiquement. Une boule de silicone est positionnée à l'autre extrémité du cathéter à 3,6 cm de l'orifice, distance correspondant à celle qui a été introduite dans la veine jugulaire (Figure 24a).

1.3.2. La chirurgie

Pour l'implantation du cathéter à proprement parler nous avons repris une technique précédemment décrite (*Caine et al., 1993*). Tout d'abord les rats ont été anesthésiés par une injection i.p. (1 ml/kg) d'un mélange contenant 0,1 g/ml de kétamine (*Imalgene 1000®* de Merial, Centravet, Dinan, France) et 2% de xylazine (*Rompun®* de Bayer AG, Centravet). Puis deux incisions ont été effectuées : l'une au niveau du dos afin de dégager un espace sous cutané permettant le bon positionnement de la maille de *mersilène®* et du pas de vis du cathéter, l'autre au niveau du cou afin de dégager la veine jugulaire droite du rat. Le montage a alors été introduit par l'ouverture dorsale et le pas de vis est externalisé au milieu du dos au niveau des omoplates du rat. L'extrémité libre a été ramenée au niveau de l'incision du cou grâce à un espace sous cutané allant de la nuque à la clavicule droite du rat. Une petite incision a été pratiquée dans la veine jugulaire et le cathéter introduit sur une distance exacte de 3,6 cm. Puis il a été fixé à la veine et aux tissus musculaires environnant par des points de suture réalisés avec du fil de soie 5-0 (Ethicon). L'animal a ensuite été suturé au niveau du dos et du cou avec du fil de soie 3-0 (Ethicon). Les soins postopératoires ont consisté, d'une part en une injection sous cutanée de carprofène, un anti-inflammatoire non stéroïdien (*Rimadyl®* de Pfizer, Centravet), d'autre part en un nettoyage des plaies avec de la Biseptine® (Bayer, Leverkusen, Allemagne) et une application de crème cicatrisante (*Cicaplast®* de La Roche-Posay, L'Oréal, Paris, France). La fluidité du cathéter est vérifiée une fois par jour pendant toute la durée de récupération postopératoire par l'injection de 150 µl d'un mélange contenant 300 U/ml d'héparine (*Heparine choay®*, Sanofi-Aventis, Paris, France) et 0,1 g/ml d'ampicilline (*Unacim®* 1g, Pfizer, NY, Etats-Unis), afin de prévenir la coagulation du sang dans le cathéter et l'apparition d'infections.

1.3.3. La chambre d'auto-administration

Toutes les sessions d'AA ont eu lieu dans des chambres construites en plastique noir (30 x 30 x 30 cm) possédant un socle amovible pour faciliter le nettoyage entre chaque session et un couvercle ne laissant pas passer la lumière (Figure 24b). Les conditions d'expérimentation sont telles que les bruits extérieurs sont atténués. Une pompe (Imetronic, Pessac, France), commandée par ordinateur, portant une seringue de 5 ml injecte la drogue via un tube en Silastic (Plastics One) de 0,63 mm de diamètre interne et 1,19 mm de diamètre externe. Ce tube est raccordé à l'autre extrémité à une canule tournante à une voie (Instech Laboratories, PA, Etats-Unis), elle-même fixée à une potence située sur le dessus de chacune des chambres.

Un second tube de même facture fait le lien entre la canule tournante et la partie externalisée du guide canule 22 gauges situé sur le dos du rat. Ainsi un lien existe entre la seringue contenant la cocaïne et le cathéter placé à demeure dans la veine jugulaire du rat. L'animal dans ces conditions reste totalement libre de ses mouvements. Chaque chambre est équipée de deux orifices de 3 cm de diamètre situés sur une même paroi de la chambre, à 4 cm au-dessus du socle (Figure 24b) ; un des trous est appelé « orifice actif » car il est à l'origine de la délivrance de la drogue, l'autre trou est alors appelé « orifice inactif ». Les deux orifices sont contrebalancés entre les positions droite et gauche au sein des différents groupes expérimentaux. Lorsqu'un rat introduit son museau dans un des orifices, on dit qu'il fait un « nose-poke » (NP). Un NP, fait au hasard dans un orifice, induit la rupture d'un rayon infrarouge situé à l'intérieur de chaque orifice. Une carte digitale (DIO-24, National Instruments, TX, Etats-Unis) et le logiciel LabView (National Instruments) permettent de détecter la rupture de ce rayon infrarouge. Les NP dans les deux orifices sont enregistrés. Les NP dans l'orifice inactif n'ont pas d'effets programmés. Les NP dans l'orifice actif induisent, par l'intermédiaire de l'ordinateur, l'injection sur une durée de 2 sec de 40 µl d'une solution de cocaïne. Un stimulus lumineux, situé 20 cm au-dessus de l'orifice actif, s'allume de façon contingente avec l'injection de la drogue et reste allumé pendant les 40 sec de la période réfractaire (Figure 24c); période pendant laquelle tout NP dans l'orifice actif est enregistré, mais n'est pas sujet à une injection supplémentaire de drogue.

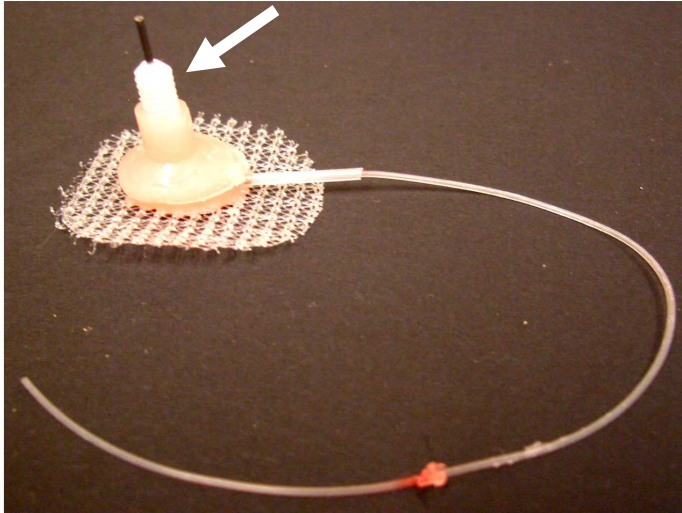
1.3.4. Protocoles d'auto-administration de cocaïne

Dans tous les protocoles, l'animal a eu le choix de consommer ou non la cocaïne. La TsA 0,03 ou 0,3 mg/kg, le PhB 2 ou 20 mg/kg et les solutions véhicules appropriées ont toujours été injectés en i.v. 30 min avant le début de chaque session d'AA, que ce soit pour le FR1 ou le PR. La dépudécine a été injectée en i.c.v. 30 min avant le début de chaque session.

1.3.4.1. *Ratio fixe*

Les rats ont effectué des sessions de FR1, une fois par jour pendant 2 h, le nombre de sessions variant en fonction des études. Dans le protocole de FR1, chaque NP dans l'orifice actif, en dehors de la période réfractaire de 40 sec, induit une injection i.v. de cocaïne. Aucune limite concernant le nombre d'injections que le rat est capable de faire pendant une session de 2 h n'a été instaurée. Les expériences de FR1 ont été réalisées avec deux doses de cocaïne : 0,33 mg/kg/injection et 0,75 mg/kg/injection.

a



b



c



Figure 24 : L'AA de cocaïne par le rat

(a) Cathéter qui a été implanté dans la jugulaire des rats. La partie métallique et le pas de vis, indiqué par la flèche, sont les 2 seuls éléments qui apparaîtront sur le dos du rat, une fois l'opération terminée.

(b) La cage d'AA avec les deux orifices à l'avant.

(c) Un rat rattaché au système d'injection et venant de procéder à une injection (lumière allumée).

1.3.4.2. Ratio progressif

Certains rats, au bout de sept jours de FR1, ont effectué des sessions de PR. Dans le protocole de PR, le nombre de NP requis pour obtenir une injection supplémentaire croît selon l'équation exponentielle (*Richardson and Roberts, 1996*) suivante, où n représente le rang des injections successives (Figure 25):

$$NP(n) = [5 \cdot e^{0,2n}] - 5$$

Chaque session dure au maximum 5 h, mais elle est arrêtée avant si l'animal n'effectue pas le nombre de NP requis pour l'obtention d'une injection supplémentaire de drogue pendant un laps de temps d'1 h. Le point de rupture correspondant au ratio maximal atteint par l'animal a été déterminé pour chaque rat.

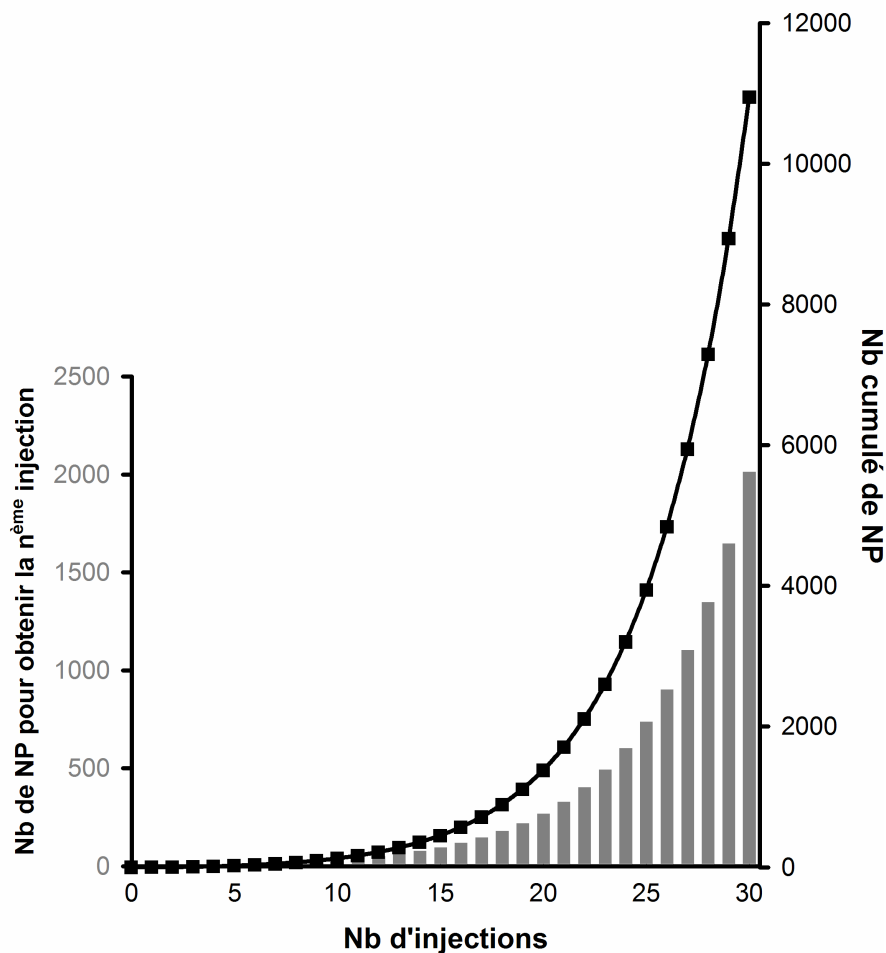


Figure 25 : **Protocole de PR**

Les histogrammes (axe de gauche) représentent le nombre de NP que le rat doit effectuer pour obtenir une injection supplémentaire de drogue, d'après la relation de (*Richardson and Roberts, 1996*) : $NP(n) = [5 \cdot e^{0,2n}] - 5$ où n représente le rang des injections successives. La courbe (axe de droite) représente le nombre cumulé de NP que le rat doit faire depuis le début de la session pour obtenir l'injection n .

1.4. Auto-administration de saccharose

1.4.1. Particularités de la chambre

L'utilisation de saccharose à la place de la cocaïne ou de tout autre produit toxicomanogène a pour but d'étudier les effets de composés pharmacologiques sur la consommation d'un renforçant naturel et non artificiel.

Les rats qui ont été utilisés pour ces expériences n'ont jamais consommé de cocaïne, mais ont également été opérés et portent un cathéter à demeure dans la veine jugulaire. Les expériences d'AA de saccharose se sont déroulées dans les mêmes chambres que pour l'AA de cocaïne. Une fenêtre de 4 x 4 cm située à 4 cm au-dessus du socle de la chambre et positionnée sur le mur adjacent à l'orifice actif a pour but de permettre au rat de boire une solution sucrée à partir d'une mangeoire placée en dehors de la chambre. Lorsque le nombre de NP requis est effectué dans l'orifice actif, alors 300 µl d'une solution de saccharose 10% (Sucre Erstein, Erstein, France) est déposée dans le container grâce à une seringue située sur une pompe commandée par ordinateur.

1.4.2. Protocoles d'auto-administration de saccharose

Les rats ont effectué des sessions de FR1 et de PR comme décrit pour l'AA de cocaïne. Deux jours après l'opération chirurgicale, ils ont eu accès pendant 48 h uniquement à une solution contenant 4% de saccharose, pour les habituer à boire de l'eau sucrée et éviter ainsi toute néophobie lors de la première session de FR1. Puis la solution de saccharose 4% est à nouveau remplacée par de l'eau. Sept jours après la chirurgie, les rats ont été privés d'eau pendant 20 h, puis placés 1 h dans la chambre d'AA, avec la mangeoire contenant 2 ml d'une solution de saccharose 10%. Après cette session d'entraînement, les rats ont été replacés dans leur cage d'habitation avec un accès à de l'eau pendant 4 h. Le lendemain, toute la procédure d'entraînement est répétée une seconde fois. Une réelle session de 2 h de FR1, mais sans aucun traitement pharmacologique, débute après la seconde journée d'entraînement afin de répartir les rats dans des groupes comparables pour ce qui concerne la consommation de base en eau sucrée. Les traitements pharmacologiques, suivis d'une session de FR1 débutent le jour suivant. La TsA ainsi que la solution véhicule de DMSO 10% ont été injectés 30 min avant le début de chaque session d'AA.

1.5. Test de préférence au saccharose

Dès leur arrivée au laboratoire et pendant les trois semaines d'habituation, les rats ont à leur disposition deux biberons contenant de l'eau. Par la suite et pendant 48 h, ils ont uniquement accès à deux biberons contenant une solution de saccharose 1% pour les habituer à boire de l'eau sucrée. Puis ils sont placés en cage individuelle avec un accès pendant 24 h à la solution sucrée, puis pendant trois jours à de l'eau. Ils sont ensuite testés une première fois. Le test consiste à mettre les rats dans une nouvelle cage pendant 3 h sans accès à aucun liquide, puis de leur donner accès à deux biberons simultanément : un contenant de l'eau, l'autre contenant la solution de saccharose 1%. La quantité de liquide ingérée est mesurée sur une période de 60 min et le pourcentage de préférence au saccharose est calculé de la manière suivante :

$$\text{Pourcentage} = 100 \cdot \text{volume saccharose} / (\text{volume saccharose} + \text{volume eau}).$$

Puis les rats sont replacés dans leur cage d'habitation avec un accès à l'eau *ad libitum*. Deux jours plus tard, ils sont opérés pour l'implantation du cathéter dans la veine jugulaire comme pour les expériences d'AA. Après cinq jours de récupération postopératoire, les traitements pharmacologiques par la TsA ou la solution véhicule de DMSO 10% débutent pour quatre jours. Trente min après la 4^{ème} injection, les animaux sont à nouveau testés pour leur préférence au saccharose. Les volumes ingérés et le pourcentage de préférence au saccharose de ce second test sont alors comparés à ceux du premier test fait avant le traitement par la TsA.

1.6. Activité locomotrice

1.6.1. Cage d'activité locomotrice

Dans le but de mesurer l'activité locomotrice spontanée des rats, ceux-ci ont été placés individuellement dans des cages en plexiglas de 30 x 45 cm et 35 cm de hauteur. Un détecteur infrarouge (IRP 124 de Talco, Technyrem, Bessancourt, France) situé au-dessus de la cage est placé derrière une lentille de Fresnel permettant de subdiviser la cage en secteurs. Le logiciel Labview (National Instruments) contrôle le détecteur et enregistre le nombre de fois qu'un rat passe d'un secteur à l'autre dans la cage sur une période de 5 min.

1.6.2. Activité locomotrice spontanée

Comme pour l'AA, les rats ont été opérés afin d'implanter le cathéter dans la jugulaire. Après cinq jours de récupération postopératoire, les rats ont été traités pendant trois jours en i.v. avec la TsA 0,3 mg/kg ou la solution véhicule de DMSO 10% puis replacés dans leur cage

d'habitation. Le 4^{ème} jour, 30 min après la 4^{ème} injection, les animaux ont été testés pour leur activité locomotrice spontanée dans le nouvel environnement que représente la cage de mesure d'activité locomotrice. Leur activité a été enregistrée pendant 2 h.

1.6.3. Sensibilisation comportementale

Les rats ont été opérés pour implantation du cathéter dans la jugulaire. Après cinq jours de récupération postopératoire, ils ont été placés dans la cage de mesure d'activité locomotrice afin de s'habituer à ce nouvel environnement. Quatre-vingt-dix min plus tard ils ont reçu une injection i.v. de TsA 0,3 mg/kg ou de DMSO 10% et 30 min plus tard une injection i.v. de cocaïne 1 mg/kg. L'hyperactivité induite par la cocaïne a alors été enregistrée pendant 2 h. L'acquisition de la sensibilisation comportementale est réalisée par répétition de ce traitement pendant cinq jours. Suit une période d'abstinence de cinq jours pendant laquelle l'animal ne reçoit aucune injection de cocaïne et n'effectue aucun test. Enfin, l'expression de la sensibilisation est mesurée le 11^{ème} jour après une injection de cocaïne 1 mg/kg en i.v.

1.7. Préférence de place induite par la nicotine

1.7.1. Cage d'expérimentation

Le modèle animal décrit permet d'évaluer l'intensité du souvenir et de la valeur hédonique que la nicotine produit sur les rats. Ces effets pouvant être appétitifs ou aversifs.

L'ensemble de l'expérimentation se déroule dans des boîtes en plexiglas opaque de 60 x 25 cm et 30 cm de hauteur, divisées en deux compartiments égaux (30 x 25 cm) séparés par une cloison (Figure 2-). Cette dernière comporte une porte à guillotine pour que selon l'étape du protocole le rat puisse passer librement d'un compartiment à l'autre ou être confiné dans un compartiment donné. Ces deux compartiments présentent des stimuli olfactifs, tactiles et visuels distincts :

- Des parois comportant des rayures noires et blanches alternées horizontalement, un sol composé d'une plaque de métal comportant des petits trous et une litière connue des animaux (la même que dans la cage d'habitation), mais sur laquelle quelques gouttes d'acide acétique 2% ont été versées.
- Des parois comportant des rayures noires et blanches alternées verticalement, un plancher composé de barreaux métalliques serrés et une litière non connue des animaux (différente de celle utilisée dans la cage d'habitation).

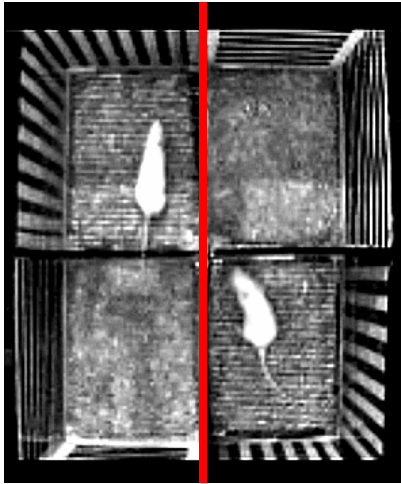


Figure 26 : **La préférence de place**

Vue du dessus de deux chambres de préférence de place (ligne verticale séparant les deux chambres). Le rat en bas à droite est devant la porte séparant les deux demi-cages de droite.

1.7.2. Protocole de conditionnement

Le conditionnement de place consiste en trois phases :

- 1ère étape : le préconditionnement (un jour)

Durant une session de 10 min le rat a libre accès aux deux compartiments de la cage et le temps passé dans chacun d'eux est chronométré, déterminant ainsi la préférence de place spontanée. Si les rats passent plus de 50% du temps dans un compartiment, c'est qu'il existe un biais comportemental.

- 2ème étape : le conditionnement (quatre jours)

Chaque matin, le rat reçoit une injection sous-cutanée de PBS et est immédiatement confiné pendant 20 min dans un des deux compartiments. L'après-midi, le même rat reçoit une injection sous-cutanée de nicotine 0,21 mg/kg dans le cas de la CPP et de 2 mg/kg dans le cas de la CPA, puis il est immédiatement confiné 20 min dans l'autre compartiment. L'assignement du compartiment associé à l'injection de nicotine est contrebalancé entre les rats au sein des différents groupes expérimentaux.

- 3ème étape : le postconditionnement ou test (un jour)

Durant une session unique de 10 min, le rat a de nouveau libre accès aux deux compartiments et le temps passé dans chacun d'eux est chronométré. Le temps passé dans le compartiment associé à la nicotine après conditionnement est comparé au temps passé dans ce même

compartiment avant conditionnement. S'il augmente significativement, on parle de CPP induite ; s'il diminue, on parle de CPA.

Le PhB 100 mg/kg ainsi que la solution véhicule ont toujours été injectés i.p. 30 min avant l'injection sous-cutanée de nicotine ou de PBS, ou, en d'autres termes, 30 min avant le début de chaque session de conditionnement.

2. Techniques biochimiques

2.1. Prélèvements de structures cérébrales

Pour les dosages d'activité enzymatique, l'analyse génomique et l'étude de la transcription, les rats ont été anesthésiés 2 h après la 4^{ème} session d'AA de cocaïne (FR1 ; 0,33 mg/kg/injection) avec du pentobarbital (Doléthal® de Vetoquinol, Centravet ; 100mg/kg) puis décapités. Leur cerveau a alors été découpé manuellement en tranches d'1 mm d'épaisseur (Figure 2è) :

- 1ère coupe devant les tubercules olfactifs
- 2ème coupe au milieu des tubercules olfactifs
- 3ème coupe derrière les tubercules olfactifs (non gardée)
- 4ème coupe 2 mm plus caudale, au niveau de l'hypophyse
- reste du cerveau postérieur

Sur la 1^{ère} tranche, on sépare la partie ventrale, constituée des bandelettes olfactives, de la partie dorsale, constituée du cortex préfrontal, qui contient dans sa partie médiane (1 mm de part et d'autre du sillon inter-hémisphérique) le CgCx. Sur la 2^{ème} tranche, on extrait par punch le NAc situé autour de la commissure antérieure et le CPu. Sur la 4^{ème} tranche, en faisant une coupe dans le prolongement du corps calleux, on récupère l'amygdale de chaque côté. Sous le corps calleux, on prélève l'hippocampe dorsal. Sur la partie postérieure de l'encéphale, on prend le cervelet puis on coupe l'ensemble restant en deux « hémisphères ». Sur chaque hémisphère, il est possible de séparer l'hippocampe ventral du reste du cortex. Les structures ainsi obtenues sont stockées au congélateur à -80°C.

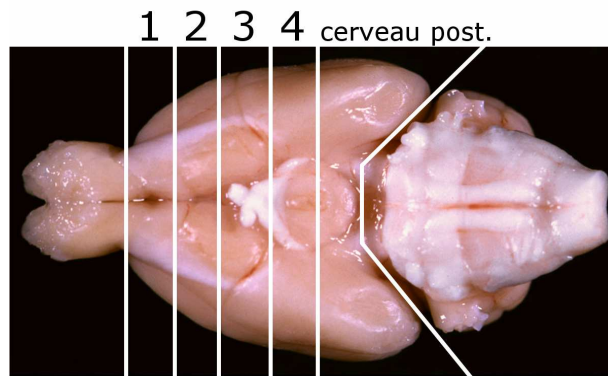


Figure 27 : **Schéma des niveaux de coupes du cerveau de rat**

Après avoir enlevé le bulbe olfactif, les quatre coupes sont effectuées devant, au milieu et derrière les tubercules olfactifs ainsi qu'au niveau de l'hypophyse afin d'obtenir les quatre tranches.

2.2. Dosage de l'activité HDAC

2.2.1. Extraction de la fraction nucléaire

Les structures cérébrales sont décongelées, puis broyées (RZR 2102 control, Heidolph, Francfort-sur-le-Main, Allemagne) dans du tampon d'homogénéisation (1 ml / 100 mg ; composition ci-dessous). Suite à une centrifugation à 1000 g pendant 20 min, le culot contenant les extraits nucléaires est repris dans le même tampon (1 ml / 100 mg).

<u>Tampon d'homogénéisation :</u>	Hepes pH 7,9	20 mM
	EDTA	0,2 mM
	Dithiothréitol	0,5 mM
	Phénylméthylsulfonylfluoride	0,5 mM
	KCl	0,1 M
	Glycérol	20%

2.2.2. Dosage des protéines

La concentration en protéines nucléaires est déterminée par la méthode de Bradford (*Bradford, 1976*) basée sur l'adsorption du colorant Bleu de Coomassie G-250. En milieu acide, ce colorant se lie aux protéines, ce qui provoque le déplacement de son pic d'absorption de 465 nm (rouge) à 595 nm (bleu).

Cinq μ l d'extrait nucléaire sont ajoutés à 200 μ l d'une solution contenant 20% de réactif de Bradford (Biorad Protein Assay, BIO-RAD, France). L'absorption de la solution est mesurée à 595 nm. La quantité de protéines de l'échantillon est déterminée à l'aide d'une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions avec des quantités croissantes d'albumine sérique bovine (Sigma Aldrich) allant de 1 à 10 μ g.

2.2.3. Dosage de l'activité enzymatique

Le dosage de l'activité désacétylase de la totalité des HDAC nucléaires est réalisé dans des plaques de 96 puits transparentes (Fischer Scientific, Illkirch, France) par la technique *Fluor de Lys*TM (BIOMOL, TEBU-BIO, Le Perray en Yvelines, France). Le test comporte deux étapes. Tout d'abord, 25 µl d'un Substrat *Fluor de Lys*TM possédant une chaîne latérale contenant une lysine acétylée (250 µM) sont ajoutés à 20 µg de protéines nucléaires diluées dans 25µl de tampon (composition ci-dessous). Après 20 min d'incubation à 30°C, la réaction enzymatique est stoppée par l'addition de 50 µl d'une solution de TsA 2 µM et la fluorescence est générée à partir du substrat désacétylé par l'ajout du Développeur. Après 15 min elle est mesurée dans un lecteur de plaque 96 puits (MicroLumat Plus LB; excitation, 380 nm; émission, 460 nm). L'activité HDAC est exprimée en unité arbitraire de fluorescence par min par mg de protéines (AFU/min/mg of prot.).

<u>Tampon de dosage d'activité HDAC :</u>	Tris-Cl pH 8,0	50 mM
	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	MgCl ₂	1 mM

2.3. Analyse génomique

2.3.1. Extraction des ARN

Toutes les étapes d'extraction sont réalisées sur la glace selon une méthode adaptée de celle de (*Chomczynski and Sacchi, 1987*). Les structures cérébrales stockées à -80°C dans une solution de thiocyanate de guanidinium (composition page suivante) sont décongelées, puis broyées à l'aide d'un homogénéisateur (Polytron PT 10-35, Kinematica, Lucerne, Suisse). Une première extraction phénol/chloroforme en présence d'acétate de sodium (2 M ; pH 4) a pour but de séparer les protéines des ARN. Ces derniers sont récupérés dans la phase aqueuse après une centrifugation de 45 min à 3000 g. Les ARN sont précipités par l'ajout d'isopropanol à -20°C pendant une nuit. Après une nouvelle centrifugation de 45 min à 10000 g, le culot contenant les ARN est repris dans une solution de thiocyanate de guanidinium avant d'être à nouveau précipité de nuit à -20°C par l'ajout d'isopropanol. Après une dernière centrifugation de 45 min à 10000 g, le culot contenant les ARN est lavé à deux reprises à l'aide d'une solution d'éthanol à 75% avant d'être séché dans une cloche à vide. Les ARN ainsi obtenus sont repris dans de l'eau stérile à une concentration de 1 mg/ml puis aliquotés et stockés à -20°C.

<u>Solution de thiocyanate de guanidinium :</u>	Thiocyanate de guanidium	4 M
	N-lauryl-sarcosine	0,5%
	2-β-mercapto-éthanol	0,1 M
	EDTA	0,05 M

Le 2-β-mercapto-éthanol est ajouté extemporanément (360 µl / 50 ml de solution)

2.3.2. Analyse de la qualité des ARN

Afin de vérifier la qualité des ARN, deux analyses ont été réalisées. D'une part, les ARN extraits sont analysés sur un gel d'agarose 1% en présence de 2% de formaldéhyde et de tampon de migration MPOS 1X (composition ci-dessous). Des échantillons de 2 µg d'ARN sont déposés dans un tampon de dépôt (composition ci-dessous) additionné extemporanément de bromure d'éthidium. La séparation des ARN s'effectue par une électrophorèse à 50 V durant 5 à 6 h. Le bromure d'éthidium incorporé dans les ARN a pour propriété de révéler, sous lumière UV (GeneGnome HR, Syngene, Cambridge, Royaume-Uni), la présence de deux bandes principales sur le gel, correspondant aux ARN ribosomiaux 18S et 28S. L'intensité des bandes du gel permet de confirmer les concentrations relatives d'ARN mesurées au spectrophotomètre. Cette analyse permet aussi de vérifier la non-dégradation des ARN durant l'extraction.

D'autre part, la mesure de la densité optique (DO) des échantillons à 260 nm et à 280 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV (Safas, Monaco) suivie du calcul du rapport $DO_{260\text{ nm}} / DO_{280\text{ nm}}$ a pour but de vérifier la non-contamination protéique et de déterminer la concentration des échantillons d'ARN. Si ce rapport n'est pas supérieur à 1,8 cela signifie la présence de contaminants protéiques.

<u>Tampon MOPS 1X, pH 7 :</u>	MOPS	20 mM
	Acide [N-Morpholio]-propane-sulfonique	
	Acétate de sodium	5 mM
	EDTA	1 mM

<u>Tampon de dépôt :</u>	Formamide	12,5 ml
	MOPS 10X	2,5 ml
	Formaldéhyde 37%	4 ml
	Bromure d'éthidium 0,1%	1 ml

2.3.3. Microarrays

2.3.3.1. Principe de l'expérience

L'analyse des effets de la TsA sur l'expression des gènes chez les rats s'auto-administrant de la cocaïne pendant quatre jours a été faite à l'aide de la technique des microarrays (Affymetrix, CA, Etats-Unis). Pratiquement, les ARN sont dans un premier temps convertis en ADN double brin complémentaire (ADNc). Pour cela des amorces oligo-dT sont utilisées afin de sélectionner les ARNm. Puis ces ADNc sont transcrits en ARN complémentaires en présence de ribonucléotides biotinylés. Ces ARN sont alors fragmentés puis hybridés sur la puce GeneChip® Rat Genome 230 2.0 Array, permettant d'analyser l'expression de plus de 31000 échantillons. Les microarrays sont traités avec de la streptavidine conjuguée à de la phycoérythrine, puis lavés. L'acquisition et la quantification des données sont réalisées avec un scanner 3000 7G Affymetrix (Figure 28a). En théorie, l'intensité du marquage obtenue est proportionnelle à la quantité d'ARNm initialement présent dans l'échantillon. En pratique, ces puces Affymetrix apportent principalement des données qualitatives.

Sur la puce, chaque gène est représenté, au minimum, au niveau d'un « échantillon » par plus d'une dizaine de paires d'oligonucléotides de vingt-cinq bases (Figure 28b). Chaque paire est formée d'un oligonucléotide parfaitement complémentaire à une partie de la séquence du gène d'intérêt et d'un oligonucléotide dit « mismatch » car différant de l'autre uniquement d'une base. L'oligonucléotide « mismatch » est utilisé pour estimer le niveau d'hybridation non spécifique sur la puce.

L'expérience a nécessité douze rats : six traités par de la TsA 0,3 mg/kg 30 min avant chaque session d'AA et six injectés i.v. avec la solution véhicule. Les rats ont été euthanasiés 2 h après la fin de la 4^{ème} session d'AA et leurs CgCx et NAc prélevés. Nous avons alors regroupé deux structures cérébrales identiques en un même échantillon. Au final nous avons analysé douze échantillons à l'aide de douze puces : 3 CgCx_véhicule, 3 CgCx_TsA, 3 NAc_véhicule et 3 NAc_TsA.

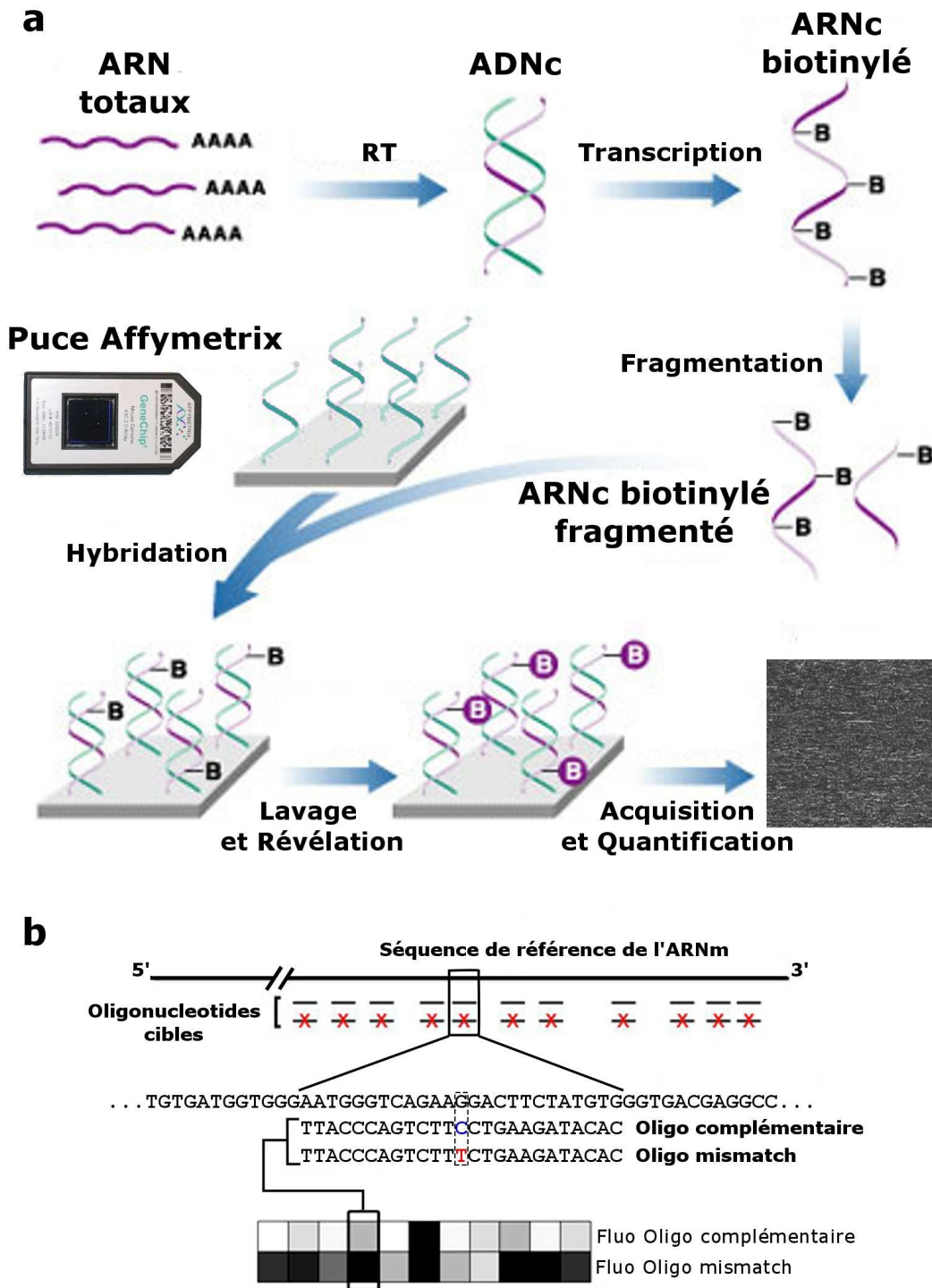


Figure 28 : **Schéma de l'expérience des microarrays**

(a) Ensemble des étapes nécessaires à la réalisation des microarrays. L'ensemble des ARNm est rétrotranscrit en ADNc à l'aide d'amorces oligo-dT, puis ils sont transcrits et marqués à la biotine avant d'être fragmentés. Ces fragments sont alors hybridés sur la puce Affymetrix, révélés et une image en haute résolution de la puce est acquise. Le signal obtenu permet de quantifier l'expression d'ARN. AAAA = queue polyadénosine caractéristique des ARN messagers. (b) Schéma représentant les deux types d'oligonucléotides de vingt-cinq bases présents à la surface des puces : l'un est parfaitement complémentaire de la séquence d'ARN recherché, l'autre est dit « mismatch » car différant du premier uniquement d'une base (ici un T remplace le C). Fluo = fluorescence, Oligo = oligonucléotide, RT = transcription reverse.

2.3.3.2. Analyse statistique

Les données acquises à partir des puces ont été analysées à l'aide du logiciel Affymetrix GeneChip Operating (GCOS v1.4 ; Microarray Suite (MAS 5.0) algorithm). Avec l'aide de cet algorithme MAS 5.0, deux analyses ont été faites :

- Une analyse absolue pour laquelle un algorithme de détection est utilisé :
 - Celui-ci sert à associer une valeur de détection à chaque échantillon (présent ou absent), afin de déterminer si celui-ci est détecté significativement par la puce, ainsi qu'une valeur de signal reflétant le niveau d'expression du transcrit correspondant.
- Une analyse comparative où deux algorithmes sont utilisés :
 - Le premier permet d'associer une valeur de changement à chaque échantillon afin de déterminer si son taux d'expression est significativement différent entre deux échantillons (augmentation, augmentation marginale, diminution, diminution marginale, pas de changement).
 - Le second associe une p -valeur au signal log₂ ratio (SLR), entité permettant de mesurer l'amplitude du changement.

Dans cette analyse, la p -valeur est obtenue grâce au test statistique « Wilcoxon's Signed Rank test ». L'algorithme MAS 5.0 est plus sensible et plus sélectif que la méthode d'analyse par RMA dans l'identification de gènes différemment exprimés (*Irizarry et al., 2003; Millenaar et al., 2006*). A partir de ces données, pour qu'un gène soit sélectionné dans la catégorie des gènes différentiellement exprimés il faut que :

- Son échantillon soit noté comme « présent » dans les trois puces véhicules ou dans les trois puces TsA.
- Son échantillon présente au minimum deux de ses taux d'expression notés comme « augmentation / augmentation marginale » ou « diminution / diminution marginale ».
- Son échantillon présente un signal log₂ ratio supérieur à 0.58 ou inférieur à -0.58 (démontrant une amplitude de changement de 1.5 ou -1.5).

Cette méthode de sélection a permis de mettre en évidence 722 échantillons dans le CgCx et 136 échantillons dans le NAc comme étant différemment exprimés entre les groupes « véhicule » et les groupes « TsA ».

2.3.4. RT-qPCR

2.3.4.1. Principe

Les ARN totaux cellulaires, une fois isolés, sont transformés en ADNc par transcription réverse. Ces derniers sont ensuite amplifiés par qPCR en temps réel. Un cycle de qPCR est composé de trois étapes (dénaturation / hybridation / élongation) répétées de nombreuses fois au cours de la réaction. Ainsi, la réaction en chaîne aboutit à une accumulation exponentielle théorique de 2^n fois par molécule d'ADNc. Autrement dit, la quantité de produits de qPCR double à chaque cycle d'amplification suivant la relation mathématique suivante :

$$N = N_0 \times 2^n$$

(Où N est le nombre de molécules amplifiées au final, N_0 le nombre initial de molécules et n le nombre de cycles d'amplification). Le principe de la qPCR en temps réel est fondé sur la détection et la quantification d'un signal fluorescent émis par un fluorophore dont l'intensité d'émission est proportionnelle à la quantité de produits amplifiés pendant la qPCR. Dans notre étude, le système de détection repose sur l'inclusion d'un agent intercalant, le *SYBR Green®*, dans l'ADN double brin. Au cours de l'hybridation des amorces puis de l'extension réalisée par l'ADN polymérase, cet agent s'intercale entre les deux brins d'ADN nouvellement synthétisés. La fluorescence peut être mesurée en temps réel à chaque cycle de qPCR. Plus la quantité de l'ADNc recherché est initialement importante, plus le nombre de cycles nécessaires pour atteindre une valeur de fluorescence seuil supérieure à la fluorescence du bruit de fond est faible. En effet, au cours des premiers cycles d'amplification, l'intensité de la fluorescence émise est très faible. Après un certain nombre de cycles, l'accumulation des produits de qPCR entraîne une variation mesurable de l'intensité de la fluorescence émise. Le point de départ de la phase exponentielle, phase au cours de laquelle l'efficacité d'amplification est supposée rester constante, est appelé le cycle seuil. Plus précisément, le cycle seuil est le nombre de cycles pour lequel l'intensité de la fluorescence émise a dépassé une valeur seuil significativement différente du bruit de fond (figure 29a). Sa valeur sera utilisée pour la quantification relative de la quantité d'ARN des gènes d'intérêt.

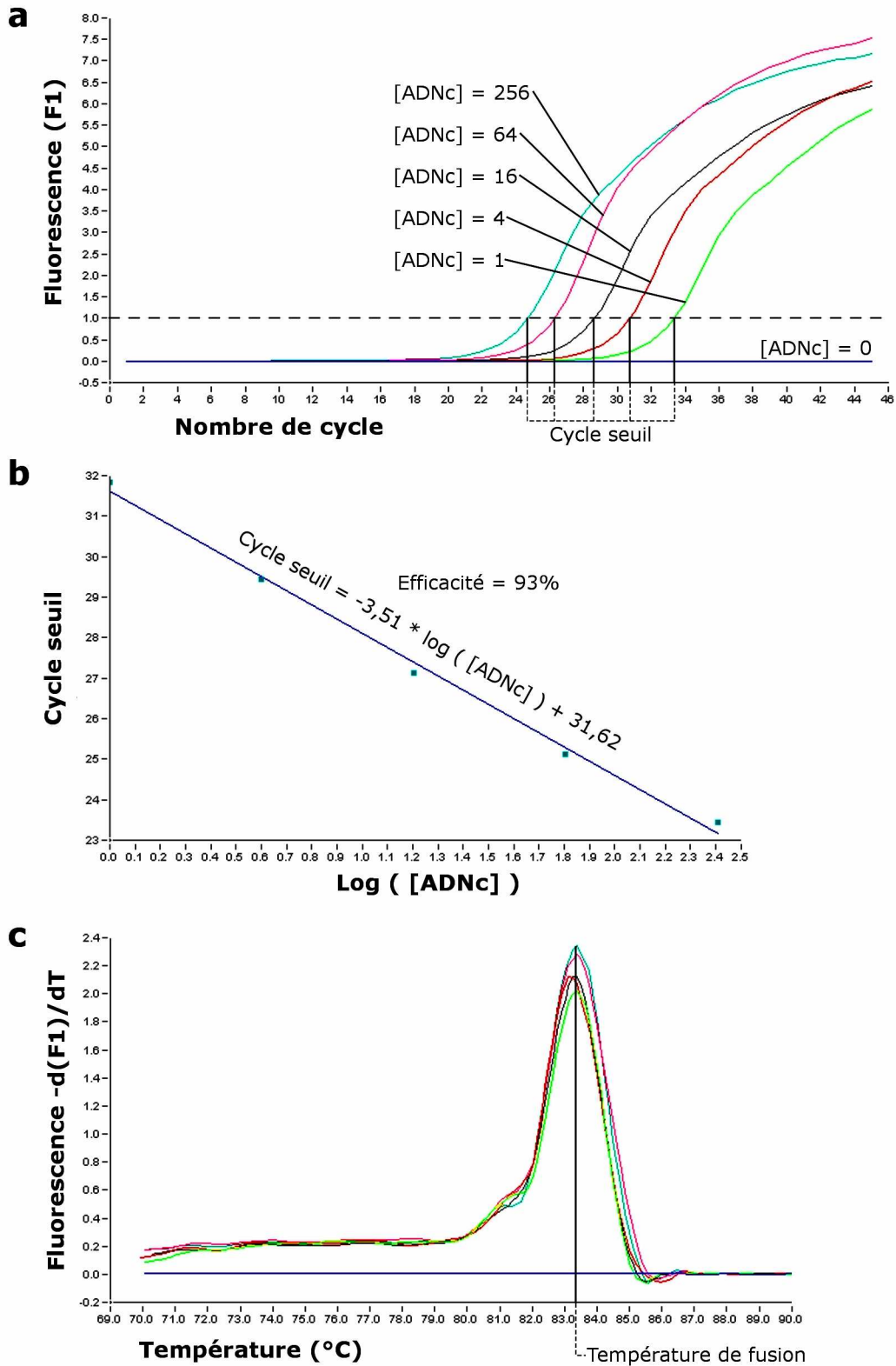


Figure 29 : **Analyse par qPCR quantitative de l'expression de gènes**

(a) Fluorogramme d'une gamme étalon réalisée avec un couple d'amorces dirigées contre HDAC2.

(b) La pente de la courbe permet de déterminer l'efficacité de la qPCR quantitative.

(c) Graphique permettant de déterminer la température de fusion des amplicons générés.

2.3.4.2. *Transcription réverse*

Les ARNm (1 µg) sont rétrotranscrits en ADNc à l'aide du kit *SuperScript II Reverse Transcriptase*® (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). La réaction est effectuée dans un volume final de 20 µl en présence de dNTPs (0,5 mM chacun / réaction), d'amorces aléatoires (hexanucléotides, 15 ng / réaction), d'un inhibiteur de RNase (RnasOUT, 2 U / réaction), d'un tampon de réaction et de l'enzyme SuperScript II Reverse Transcriptase (10 U / réaction). La réaction est réalisée à 42°C pendant 50 min Les ADNc sont ensuite aliquotés et stockés à -20°C.

2.3.4.3. *La réaction de polymérisation en chaîne quantitative*

L'amplification des ADNc s'effectue dans des capillaires en verre dans un volume final de 12 µl à l'aide du kit *qPCR- & GO for capillaries Green*® (Qbiogen, MP biomédical, Illkirch, France). Chaque expérience s'effectue en présence de 0,5 mM de chaque dNTPs, de 2,5 mM de MgCl₂ et de l'enzyme Taq ADN polymérase. De plus 0,5 µM d'un couple d'amorces spécifique à chaque gène étudié est rajouté dans chaque réaction. L'appareil de qPCR en temps réel utilisé est le *LightCycler*® (Roche Diagnostics, Meylan, France). Les taux d'expression des ARNm étudiés sont normalisés par rapport à ceux de l'ARNm de la phosphoprotéine ribosomale acide P0 de rat aussi appelée 36B4 (*Laborda, 1991*)

2.3.4.3.1. *Etapas d'amplification*

Les conditions générales pour chaque qPCR, variant légèrement en fonction du couple d'amorces utilisé, sont les suivants :

- 1ère étape : activation de l'enzyme Taq ADN polymérase à 95°C pendant 90 sec.
- 2ème étape : amplification (n cycles), les conditions typiques sont les suivantes :
 1. dénaturation à 95°C pendant 5 sec
 2. hybridation des amorces à 58-61°C pendant 5 sec
 3. élongation à 72°C pendant 10-12 sec

A la fin de chaque cycle d'amplification, une mesure de fluorescence est effectuée.

- 3ème étape : la courbe de fusion
 1. dénaturation des produits de qPCR à 95°C pendant 10 sec
 2. réhybridation des produits à 70°C pendant 15 sec

3. dénaturation progressive par montée régulière de la température jusqu'à 95°C, à raison de 0,1°C par sec et mesure en continu de la fluorescence.

Cette étape permet de déterminer la température de fusion (Figure 29c) caractéristique des amplicons générés, en mesurant la disparition de la fluorescence du SYBR Green® résultant de leur dénaturation. Il s'agit de la température à laquelle 50% des amplicons sont dénaturés.

2.3.4.3.2. Contrôles

Dans chaque série de qPCR, un témoin sans ADNc est réalisé pour vérifier l'absence de contamination. Une courbe standard est établie à partir de 4 dilutions en série d'une solution d'ADNc contenant le gène d'intérêt afin d'obtenir, à partir de sa pente, l'efficacité de la qPCR (Figure 29b). Elle est déterminée par l'équation suivante :

$$\text{Efficacité} = 100 \cdot [10^{(-1/\text{pente})} - 1]$$

Une efficacité de 100% correspond à une pente de -3,32. La spécificité de l'amplification et l'absence de dimères d'amorces sont confirmées par l'analyse de la courbe de fusion.

2.3.4.3.3. Création des couples d'amorces

Afin de définir des couples d'amorces nécessaires pour amplifier un gène donné, les séquences génomiques et les séquences d'ADNc ont été recherchées pour l'ensemble des gènes présentés dans le Tableau 11. Afin de définir la structure de chaque gène avec ses limites exon / intron, un alignement de ces séquences a été réalisé en utilisant les logiciels du National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> ; « BLAST », « Align »). Une fois ces données obtenues, les amorces spécifiques ont été recherchées et définies grâce au logiciel « Primer3 v.0.4.0 » (<http://frodo.wi.mit.edu/> ; Rozen and Skaletsky, 2000). Un certain nombre de contraintes ont été fixées :

- Les amorces comportent environ vingt bases
- Elles sont localisées sur deux exons distincts
- Elles contiennent un pourcentage de GC avoisinant les 50%
- Elles présentent une température d'hybridation d'environ 60°C
- Elles doivent permettre de générer des amplicons de 100 à 250 paires de bases

Tableau 11 : Couples d'amorces utilisées dans l'ensemble des études

Gène	sens	Position sur l'ADNc	Séquence (5'→3')	Température d'hybridation	Taille amplicons
36B4	F	738 à 757 (E5)	GTGCCTCACTCCATCATCAA	59,6	206
	R	924 à 943 (E6)	TCCGACTCTTCTTTGCTTC	59,6	
5HT2A	F	612 à 630 (E2)	CGCTTCAACTCCAGAACCA	60,0	173
	R	764 à 784 (E3)	GCCACAAAAGAGCCTATGAGA	59,5	
FMR1	F	1476 à 1495 (E12)	GGCAAATCCTCCATCAGTTC	59,5	164
	R	1619 à 1639 (E13)	GCATCTTCATCAGTCCTTCGT	59,3	
GABR β 2	F	599 à 618 (E6)	CGGGAGTGACAAAGATTGAG	58,3	194
	R	773 à 792 (E7)	AAAGGAGACCCAGGAGAGGA	60,2	
HDAC2	F	1242 à 1261 (E10)	CCCTCAAACATGACAAACCA	59,4	169
	R	1391 à 1410 (E11)	TGTCAGGGTCTTCTCCATCC	60,0	
HDAC5	F	1318 à 1337(E9)	GCTGAGAACGGCTTACTGG	60,0	177
	R	1476 à 1494 (E10)	GGTGAGGTGCGAGTTGGTA	59,7	
HDAC11	F	656 à 675(E8)	TACAACCGCCACATCTACCC	60,8	123
	R	759 à 778 (E9)	CCTCCTCACATTCTCTCCA	60,2	
LIS1	F	982 à 1001 (E5)	GCAAACCTTTGGCTTCCTGT	59,5	225
	R	1187 à 1206 (E7)	CCCATTCTCTGTGTCCTGTG	59,1	
MECP2	F		QuantiTect Primer Assay (QIAGEN) QT00182252		115
	R				
MEF2C	F	373 à 393 (E3)	CTGTCATCTCTGTCTGGCTTC	57,6	250
	R	603 à 622 (E4)	GCGTGTGTTGTGGGTATCTC	59,0	
PP4R2	F	767 à 786 (E7)	TTTCTTTGTCAGCCCCCTTA	59,7	184
	R	929 à 950 (E8)	CGTTCCTCAGATTCCACAGTAT	58,2	
Reeline	F	9438 à 9457 (E57)	GCAATCCATCCTTCCACCTC	61,8	130
	R	9549 à 9567 (E58)	GCTTCACAACCCACCACAA	60,6	
TSC22	F	652 à 671 (E1)	GAAGTGGAGTCTGGGGGTTT	60,3	152
	R	784 à 803 (E2)	AAGTAGAGGGCTGGGGAGTT	59,2	

F : amorce 5' → 3' R : amorce 3' → 5' E : exon où se situe l'amorce

2.4. Etudes immunologiques

2.4.1. Perfusion intracardiaques et coupes

Pour les études d'immunohistochimie les rats ont été anesthésiés 2 h après la 4^{ème} session d'AA de cocaïne (FR1 ; 0,33 mg/kg/injection) avec du pentobarbital (Centravet ; 100 mg/kg), puis injectés en intracardiaque avec 100 ml de NaCl 0,9% à 4°C et enfin fixés avec 250 ml de paraformaldéhyde 1% à 4°C, préparé dans du tampon phosphate 0,1 M (pH 7,2). Les cerveaux sont prélevés et postfixés dans le même fixateur pendant 1 h à 4°C, puis cryoprotégés par immersion dans une solution de saccharose 15%, préparée dans du tampon phosphate 0,1 M (pH 7,2) à 4°C pendant 15 h, congelés dans l'isopentane refroidi à -40°C et stockés à -80°C. Des coupes frontales d'une épaisseur de 15 µm ont été réalisées à -20°C avec un cryostat Frigocut-E2800 (Reichert Microscope, NY, Etats-Unis) puis montées sur des lames gélatinées et stockées à -80°C. Les coupes ont été réalisées au niveau du CgCx, du CPu et du NAc (Figure 30).

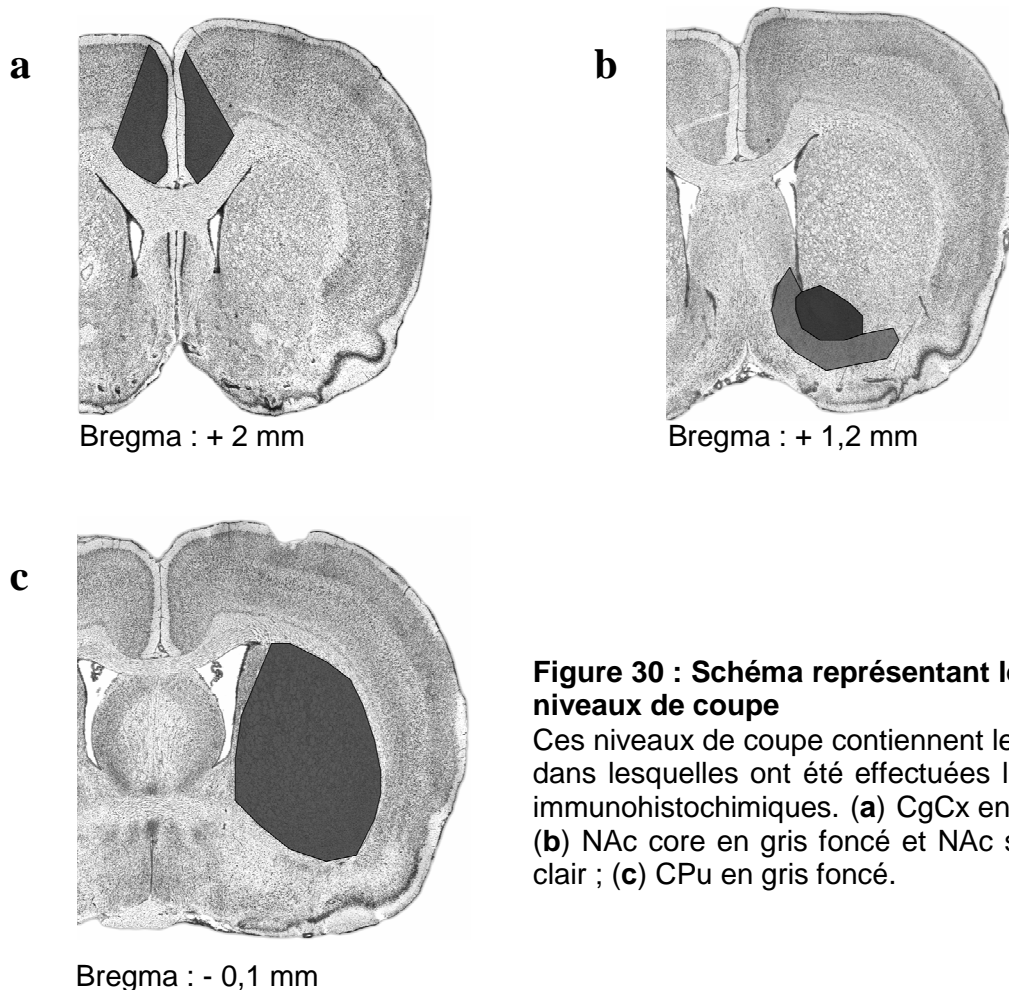


Figure 30 : Schéma représentant les différents niveaux de coupe

Ces niveaux de coupe contiennent les structures dans lesquelles ont été effectuées les analyses immunohistochimiques. (a) CgCx en gris foncé ; (b) NAc core en gris foncé et NAc shell en gris clair ; (c) CPu en gris foncé.

2.4.2. Les anticorps

Dans les deux tableaux suivants sont référencés les anticorps polyclonaux utilisés:

Tableau 12 : Liste des anticorps primaires utilisés

Nom	Origine	Espèce	Dilution
Anti-HDAC2	Santa Cruz	lapin	1/400 1/500
Anti-HDAC5	Abcam	lapin	1/150
Anti-HDAC5 (phospho-sérine 259)	Abcam	lapin	1/150
Anti-HDAC11	Abcam	lapin	1/100
Anti-LIS1	Santa Cruz	lapin	1/100
Anti-MeCP2	Upstate	lapin	1/250 1/600
Anti-MEF2C	Santa Cruz	chèvre	1/200
Anti-CREB (phospho-sérine 133)	Cell Signaling	lapin	1/800
Anti-Reeline	Santa Cruz	lapin	1/200
Anti-TSC22	Abcam	lapin	1/100

(Abcam, Cambridge, Royaume-Uni ; Cell Signaling, MA, Etats-Unis ; Santa Cruz, CA, Etats-Unis ; Upstate, Millipore, MA, Etats-Unis)

Tableau 13 : Liste des anticorps secondaires utilisés

Nom	Origine	Espèce	Dilution	Fluorochrome Absorption / Emission	
Anti-lapin biotinylé	VectorLabs	cheval	1/50		
Anti-lapin Alexa Fluor® 488	Molecular Probes	âne	1/200	495 nm	519 nm
Anti-chèvre Cy3	Jackson ImmunoResearch	âne	1/200	550 nm	570 nm

(Jackson ImmunoResearch, Suffolk, Royaume-Uni ; Molecular Probes, Invitrogen, Cergy Pontoise, France ; VectorLabs, CA, Etats-Unis)

2.4.3. Marquage immunohistochimique

2.4.3.1. Révélation à la peroxydase

Toutes les incubations ont été réalisées sous agitation à température ambiante. Les coupes sont délipidées dans de l'acétone pendant 3 à 5 min, puis séchées à l'air. Elles sont alors rincées dans du PBS 1X, perméabilisées dans du PBS 1X – triton 0,5%, puis saturées pendant 30 min dans une solution de sérum d'albumine bovine 0,5% préparée dans du PBS 1X. Après une nuit d'incubation en présence de l'anticorps primaire et de sérum de cheval, les coupes sont rincées

dans du PBS 1X, puis incubées pendant 1 h à l'obscurité avec un anticorps secondaire de cheval anti-IgG de lapin biotinylé. Elles sont rincées dans du PBS, incubées en présence du complexe peroxydase-avidine-biotine (Vectastain ABC Kit Elite, VectorLabs) pendant 1 h à l'obscurité puis rincées avec du PBS 1X. La révélation de l'activité peroxydase se fait par l'ajout pendant 8 min d'une solution contenant de la 3,3'-diaminobenzidine et de l'H₂O₂ (Peroxydase Substrate Kit, Vector, USA), qui fait apparaître un précipité brun. La réaction est arrêtée par rinçage dans de l'eau quand le rapport signal sur bruit de fond semble optimal. Des coupes, incubées uniquement avec l'anticorps secondaire biotinylé, constituent un marquage témoin. L'incubation dans 15 µM de bisbenzimidazole (Hoechst 33258, Sigma-Aldrich) pendant 15 min permet de visualiser les noyaux cellulaires. Le marquage nucléaire permet de compter la totalité des cellules et donc d'estimer le pourcentage de cellules immunoréactives. Les coupes sont ensuite montées entre lame et lamelle dans une solution de Mowiol. Les lames sont observées sous microscope binoculaire photonique (DM-RB Leitz binocular, Leica Microsystems, Wetzlar, Allemagne) équipé d'objectifs Fluotar 20X et 40X (Leica Microsystems). Des photos sont prises avec une caméra Axiocam (Carl Zeiss, Jena, Allemagne). Au moins 800 cellules sont comptées par structure sur des coupes provenant de quatre rats différents.

2.4.3.2. Marquages fluorescents

Toutes les incubations ont été réalisées dans des conditions similaires à celles utilisées pour le marquage à la peroxydase, sauf que l'anticorps secondaire est couplé à un fluorochrome et que les noyaux ne sont plus marqués avec du Hoechst 33258, mais avec du Draq5 (Biostatus, Shephed, Royaume-Uni). Les coupes sont observées avec un microscope confocal (LSM 510, Carl Zeiss) qui a l'avantage d'enregistrer la fluorescence émise par un seul plan focal (0,2 à 0,3 µm d'épaisseur) et ainsi d'éliminer toute fluorescence parasite émise par les plans supérieurs et inférieurs. Ce microscope est équipé d'une lentille à immersion à huile (Plan Apochromat 63X, Carl Zeiss) et muni de deux lasers :

- Un laser hélium/néon exciteur de la rhodamine (longueur d'onde de 543 nm) qui émet dans le rouge. Le filtre d'émission est un filtre passe-haut de 595 nm.
- Un laser argon exciteur de la fluorescéine (longueur d'onde de 488 nm) qui émet dans le vert. Le filtre d'émission est un filtre passe-bande de 515 à 550 nm.

Pour l'acquisition des images, le bruit de fond déterminé lors de l'observation d'échantillons marqués avec les seuls seconds anticorps, est systématiquement soustrait.

E. Références Bibliographiques

-A-

- Acquas E, Carboni E, Leone P, Di Chiara G (1989) SCH 23390 blocks drug-conditioned place-preference and place-aversion: anhedonia (lack of reward) or apathy (lack of motivation) after dopamine-receptor blockade? *Psychopharmacology (Berl)* 99:151-155.
- Ahmed SH, Koob GF (1999) Long-lasting increase in the set point for cocaine self-administration after escalation in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 146:303-312.
- Akbarian S, Huang HS (2009) Epigenetic regulation in human brain-focus on histone lysine methylation. *Biol Psychiatry* 65:198-203.
- Alarcon JM, Malleret G, Touzani K, Vronskaya S, Ishii S, Kandel ER, Barco A (2004) Chromatin acetylation, memory, and LTP are impaired in CBP^{+/-} mice: a model for the cognitive deficit in Rubinstein-Taybi syndrome and its amelioration. *Neuron* 42:947-959.
- Alhaider AA, Lei SZ, Wilcox GL (1991) Spinal 5-HT₃ receptor-mediated antinociception: possible release of GABA. *J Neurosci* 11:1881-1888.
- Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE (1964) Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 51:786-794.
- Allis CD, Berger SL, Cote J, Dent S, Jenuwien T, Kouzarides T, Pillus L, Reinberg D, Shi Y, Shiekhatter R, Shilatifard A, Workman J, Zhang Y (2007) New nomenclature for chromatin-modifying enzymes. *Cell* 131:633-636.
- Ambre J, Ruo TI, Nelson J, Belknap S (1988) Urinary excretion of cocaine, benzoylecgonine, and ecgonine methyl ester in humans. *J Anal Toxicol* 12:301-306.
- American Psychiatric Association (2000) DSM-IV-TR, Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, test revised, 4th Edition.
- Anden NE, Dahlstrom A, Fuxe K, Larsson K (1965) Mapping out of catecholamine and 5-hydroxytryptamine neurons innervating the telencephalon and diencephalon. *Life Sci* 4:1275-1279.
- Andersen AA, Panning B (2003) Epigenetic gene regulation by noncoding RNAs. *Curr Opin Cell Biol* 15:281-289.
- Aramori I, Nakanishi S (1992) Signal transduction and pharmacological characteristics of a metabotropic glutamate receptor, mGluR1, in transfected CHO cells. *Neuron* 8:757-765.
- Ardila A, Rosselli M, Strumwasser S (1991) Neuropsychological deficits in chronic cocaine abusers. *Int J Neurosci* 57:73-79.
- Assadi AH, Zhang G, Beffert U, McNeil RS, Renfro AL, Niu S, Quattrocchi CC, Antalffy BA, Sheldon M, Armstrong DD, Wynshaw-Boris A, Herz J, D'Arcangelo G, Clark GD (2003) Interaction of reelin signaling and Lis1 in brain development. *Nat Genet* 35:270-276.
- Aubin RJ, Frechette A, de Murcia G, Mandel P, Lord A, Grondin G, Poirier GG (1983) Correlation between endogenous nucleosomal hyper(ADP-ribosyl)ation of histone H1 and the induction of chromatin relaxation. *Embo J* 2:1685-1693.
- Avalos JL, Bever KM, Wolberger C (2005) Mechanism of sirtuin inhibition by nicotinamide: altering the NAD(+) cosubstrate specificity of a Sir2 enzyme. *Mol Cell* 17:855-868.
- Azorin JM, Kaladjian A, Pomietto-Mazzola P, Maurel-Raymondet M, Fakra E, Adida M (2004) Modèles de sensibilisation comportementale et troubles psychiques : aspects actuels. *Annales Médico-psychologiques, revue psychiatrique* 162:172-179.

-B-

- Bannon M, Kapatos G, Albertson D (2005) Gene expression profiling in the brains of human cocaine abusers. *Addict Biol* 10:119-126.
- Barnard EA, Skolnick P, Olsen RW, Mohler H, Sieghart W, Biggio G, Braestrup C, Bateson AN, Langer SZ (1998) International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev* 50:291-313.
- Barreto G, Schafer A, Marhold J, Stach D, Swaminathan SK, Handa V, Doderlein G, Maltry N, Wu W, Lyko F, Niehrs C (2007) Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation. *Nature* 445:671-675.
- Barth PG (1987) Disorders of neuronal migration. *Can J Neurol Sci* 14:1-16.
- Batchelor M, Schenk JO (1998) Protein kinase A activity may kinetically upregulate the striatal transporter for dopamine. *J Neurosci* 18:10304-10309.
- Batel P (2000) Addiction and Schizophrenia. *Eur Psychiatry* 15:115-122.
- Batty N, Malouf GG, Issa JP (2009) Histone deacetylase inhibitors as anti-neoplastic agents. *Cancer Lett* 280:192-200.

- Bedford JA, Bailey LP, Wilson MC (1978) Cocaine reinforced progressive ratio performance in the rhesus monkey. *Pharmacol Biochem Behav* 9:631-638.
- Bedford MT (2007) Arginine methylation at a glance. *J Cell Sci* 120:4243-4246.
- Beffert U, Weeber EJ, Durudas A, Qiu S, Masiulis I, Sweatt JD, Li WP, Adelman G, Frotscher M, Hammer RE, Herz J (2005) Modulation of synaptic plasticity and memory by Reelin involves differential splicing of the lipoprotein receptor Apoer2. *Neuron* 47:567-579.
- Behnke M, Eyster FD (1993) The consequences of prenatal substance use for the developing fetus, newborn, and young child. *Int J Addict* 28:1341-1391.
- Bellini C, Massocco D, Serra G (2000) Prenatal cocaine exposure and the expanding spectrum of brain malformations. *Arch Intern Med* 160:2393.
- Bergman J, Kamien JB, Spealman RD (1990) Antagonism of cocaine self-administration by selective dopamine D(1) and D(2) antagonists. *Behav Pharmacol* 1:355-363.
- Berridge CW, Waterhouse BD (2003) The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res Brain Res Rev* 42:33-84.
- Berridge KC (2007) The debate over dopamine's role in reward: the case for incentive salience. *Psychopharmacology (Berl)* 191:391-431.
- Berridge KC, Robinson TE (1998) What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Res Brain Res Rev* 28:309-369.
- Best JA, Chen Y, Piech KM, Tank AW (1995) The response of the tyrosine hydroxylase gene to cyclic AMP is mediated by two cyclic AMP-response elements. *J Neurochem* 65:1934-1943.
- Bhattacharya SK, Ramchandani S, Cervoni N, Szyf M (1999) A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. *Nature* 397:579-583.
- Bienvenu T, Chelly J (2006) Molecular genetics of Rett Syndrome: when DNA methylation goes unrecognized. *Nat Rev Genet* 7:415-426.
- Bird A (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16:6-21.
- Blandina P, Goldfarb J, Green JP (1988) Activation of a 5-HT₃ receptor releases dopamine from rat striatal slice. *Eur J Pharmacol* 155:349-350.
- Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31-39.
- Bonate PL, Swann A, Silverman PB (1997) Context-dependent cross-sensitization between cocaine and amphetamine. *Life Sci* 60:PL1-7.
- Bonicalzi ME, Haince JF, Droit A, Poirier GG (2005) Regulation of poly(ADP-ribose) metabolism by poly(ADP-ribose) glycohydrolase: where and when? *Cell Mol Life Sci* 62:739-750.
- Bouthenet ML, Souil E, Martres MP, Sokoloff P, Giros B, Schwartz JC (1991) Localization of dopamine D₃ receptor mRNA in the rat brain using in situ hybridization histochemistry: comparison with dopamine D₂ receptor mRNA. *Brain Res* 564:203-219.
- Boyes J, Bird A (1991) DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methyl-CpG binding protein. *Cell* 64:1123-1134.
- 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.
- Brami-Cherrier K, Valjent E, Herve D, Darragh J, Corvol JC, Pages C, Arthur SJ, Girault JA, Caboche J (2005) Parsing molecular and behavioral effects of cocaine in mitogen- and stress-activated protein kinase-1-deficient mice. *J Neurosci* 25:11444-11454.
- Brehm A, Miska EA, McCance DJ, Reid JL, Bannister AJ, Kouzarides T (1998) Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature* 391:597-601.
- 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, Allis CD (1996) Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation. *Curr Opin Genet Dev* 6:176-184.
- Buck KJ, Amara SG (1994) Chimeric dopamine-norepinephrine transporters delineate structural domains influencing selectivity for catecholamines and 1-methyl-4-phenylpyridinium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:12584-12588.
- Bunzow JR, Van Tol HH, Grandy DK, Albert P, Salon J, Christie M, Machida CA, Neve KA, Civelli O (1988) Cloning and expression of a rat D₂ dopamine receptor cDNA. *Nature* 336:783-787.

-C-

- Caine SB, Koob GF (1994) Effects of dopamine D-1 and D-2 antagonists on cocaine self-administration under different schedules of reinforcement in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 270:209-218.

- Caine SB, Lintz R, Koob GF (1993) Intravenous drug self-administration techniques in animals. In: Behavioural Neuroscience: A Practical Approach, pp 117-143.
- Caine SB, Negus SS, Mello NK (2000) Effects of dopamine D(1-like) and D(2-like) agonists on cocaine self-administration in rhesus monkeys: rapid assessment of cocaine dose-effect functions. *Psychopharmacology (Berl)* 148:41-51.
- Calcagnetti DJ, Schechter MD (1994) Nicotine place preference using the biased method of conditioning. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 18:925-933.
- Camporeale G, Giordano E, Rendina R, Zempleni J, Eissenberg JC (2006) *Drosophila melanogaster* holocarboxylase synthetase is a chromosomal protein required for normal histone biotinylation, gene transcription patterns, lifespan, and heat tolerance. *J Nutr* 136:2735-2742.
- Casale JF, Klein JM (1993) Illicit production of cocaine. *Forensic Science Review* 5:95-107.
- Cassel S, Carouge D, Gensburger C, Anglard P, Burgun C, Dietrich JB, Aunis D, Zwiller J (2006) Fluoxetine and cocaine induce the epigenetic factors MeCP2 and MBD1 in adult rat brain. *Mol Pharmacol* 70:487-492.
- Cervantes-Laurean D, Jacobson EL, Jacobson MK (1996) Glycation and glycoxylation of histones by ADP-ribose. *J Biol Chem* 271:10461-10469.
- Chakko S (2002) Arrhythmias associated with cocaine abuse. *Card Electrophysiol Rev* 6:168-169.
- Champagne FA, Weaver IC, Diorio J, Dymov S, Szyf M, Meaney MJ (2006) Maternal care associated with methylation of the estrogen receptor- α 1b promoter and estrogen receptor- α expression in the medial preoptic area of female offspring. *Endocrinology* 147:2909-2915.
- Chaperon F, Soubrie P, Puech AJ, Thiebot MH (1998) Involvement of central cannabinoid (CB1) receptors in the establishment of place conditioning in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 135:324-332.
- Cheng X, Blumenthal RM (2008) Mammalian DNA methyltransferases: a structural perspective. *Structure* 16:341-350.
- Chiriboga CA (1998) Neurological correlates of fetal cocaine exposure. *Ann N Y Acad Sci* 846:109-125.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.
- Chow JC, Yen Z, Ziesche SM, Brown CJ (2005) Silencing of the mammalian X chromosome. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 6:69-92.
- Churchill L, Swanson CJ, Urbina M, Kalivas PW (1999) Repeated cocaine alters glutamate receptor subunit levels in the nucleus accumbens and ventral tegmental area of rats that develop behavioral sensitization. *J Neurochem* 72:2397-2403.
- Clarke EGC (1986) Clarke's isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids and postmortem materials, 2th Edition. London: The Pharmaceutical Press.
- Clements A, Poux AN, Lo WS, Pillus L, Berger SL, Marmorstein R (2003) Structural basis for histone and phosphohistone binding by the GCN5 histone acetyltransferase. *Mol Cell* 12:461-473.
- 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.
- Colpaert FC (1999) Drug discrimination in neurobiology. *Pharmacol Biochem Behav* 64:337-345.
- 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.
- Cornish JL, Kalivas PW (2000) Glutamate transmission in the nucleus accumbens mediates relapse in cocaine addiction. *J Neurosci* 20:RC89.
- Cornish JL, Duffy P, Kalivas PW (1999) A role for nucleus accumbens glutamate transmission in the relapse to cocaine-seeking behavior. *Neuroscience* 93:1359-1367.
- Corrigall WA, Coen KM (1991) Opiate antagonists reduce cocaine but not nicotine self-administration. *Psychopharmacology (Berl)* 104:167-170.
- Cossu G, Ledent C, Fattore L, Imperato A, Bohme GA, Parmentier M, Fratta W (2001) Cannabinoid CB1 receptor knockout mice fail to self-administer morphine but not other drugs of abuse. *Behav Brain Res* 118:61-65.
- Costall B, Naylor RJ (1993) The pharmacology of the 5-HT₄ receptor. *Int Clin Psychopharmacol* 8 Suppl 2:11-18.
- Covington HE, 3rd, Maze I, LaPlant QC, Vialou VF, Ohnishi YN, Berton O, Fass DM, Renthal W, Rush AJ, 3rd, Wu EY, Ghose S, Krishnan V, Russo SJ, Tamminga C, Haggarty SJ, Nestler EJ (2009) Antidepressant actions of histone deacetylase inhibitors. *J Neurosci* 29:11451-11460.
- Crabb SJ, Howell M, Rogers H, Ishfaq M, Yurek-George A, Carey K, Pickering BM, East P, Mitter R, Maeda S, Johnson PW, Townsend P, Shin-ya K, Yoshida M, Ganesan A, Packham G (2008) Characterisation of

- the in vitro activity of the depsipeptide histone deacetylase inhibitor spiruchostatin A. *Biochem Pharmacol* 76:463-475.
- Crumb WJ, Jr., Clarkson CW (1990) Characterization of cocaine-induced block of cardiac sodium channels. *Biophys J* 57:589-599.
- Cunningham ST, Finn M, Kelley AE (1997) Sensitization of the locomotor response to psychostimulants after repeated opiate exposure: role of the nucleus accumbens. *Neuropsychopharmacology* 16:147-155.
- Cuthbert GL, Daujat S, Snowden AW, Erdjument-Bromage H, Hagiwara T, Yamada M, Schneider R, Gregory PD, Tempst P, Bannister AJ, Kouzarides T (2004) Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell* 118:545-553.
- Czermin B, Schotta G, Hulsmann BB, Brehm A, Becker PB, Reuter G, Imhof A (2001) Physical and functional association of SU(VAR)3-9 and HDAC1 in *Drosophila*. *EMBO Rep* 2:915-919.

-D-

- D'Mello GD, Stolerman IP (1977) Comparison of the discriminative stimulus properties of cocaine and amphetamine in rats. *Br J Pharmacol* 61:415-422.
- Daly K, Shirazi-Beechey SP (2006) Microarray analysis of butyrate regulated genes in colonic epithelial cells. *DNA Cell Biol* 25:49-62.
- de la Cruz X, Lois S, Sanchez-Molina S, Martinez-Balbas MA (2005) Do protein motifs read the histone code? *Bioessays* 27:164-175.
- de Ruijter AJ, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg AB (2003) Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* 370:737-749.
- de Ruijter AJ, Meinsma RJ, Bosma P, Kemp S, Caron HN, van Kuilenburg AB (2005) Gene expression profiling in response to the histone deacetylase inhibitor BL1521 in neuroblastoma. *Exp Cell Res* 309:451-467.
- De Vries TJ, Schoffelmeer AN (2005) Cannabinoid CB1 receptors control conditioned drug seeking. *Trends Pharmacol Sci* 26:420-426.
- De Vries TJ, Shaham Y, Homberg JR, Crombag H, Schuurman K, Dieben J, Vanderschuren LJ, Schoffelmeer AN (2001) A cannabinoid mechanism in relapse to cocaine seeking. *Nat Med* 7:1151-1154.
- Deary A, Gingrich JA, Falardeau P, Freneau RT, Jr., Bates MD, Caron MG (1990) Molecular cloning and expression of the gene for a human D1 dopamine receptor. *Nature* 347:72-76.
- Delle Donne KT, Sesack SR, Pickel VM (1997) Ultrastructural immunocytochemical localization of the dopamine D2 receptor within GABAergic neurons of the rat striatum. *Brain Res* 746:239-255.
- Demuth DG, Molleman A (2006) Cannabinoid signalling. *Life Sci* 78:549-563.
- Denslow SA, Wade PA (2007) The human Mi-2/NuRD complex and gene regulation. *Oncogene* 26:5433-5438.
- Depoortere RY, Li DH, Lane JD, Emmett-Oglesby MW (1993) Parameters of self-administration of cocaine in rats under a progressive-ratio schedule. *Pharmacol Biochem Behav* 45:539-548.
- Derauf C, Kekatpure M, Neyzi N, Lester B, Kosofsky B (2009) Neuroimaging of children following prenatal drug exposure. *Semin Cell Dev Biol* 20:441-454.
- Derkach V, Surprenant A, North RA (1989) 5-HT₃ receptors are membrane ion channels. *Nature* 339:706-709.
- Desai RI, Barber DJ, Terry P (2003) Dopaminergic and cholinergic involvement in the discriminative stimulus effects of nicotine and cocaine in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 167:335-343.
- Desce JM, Godeheu G, Galli T, Artaud F, Cheramy A, Glowinski J (1992) L-glutamate-evoked release of dopamine from synaptosomes of the rat striatum: involvement of AMPA and N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuroscience* 47:333-339.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258:1946-1949.
- Di Chiara G, Imperato A (1988) Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:5274-5278.
- Drouin C, Darracq L, Trovero F, Blanc G, Glowinski J, Cotecchia S, Tassin JP (2002) Alpha1b-adrenergic receptors control locomotor and rewarding effects of psychostimulants and opiates. *J Neurosci* 22:2873-2884.
- Drummond DC, Noble CO, Kirpotin DB, Guo Z, Scott GK, Benz CC (2005) Clinical development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45:495-528.
- Duvoisin RM, Zhang C, Ramonell K (1995) A novel metabotropic glutamate receptor expressed in the retina and olfactory bulb. *J Neurosci* 15:3075-3083.
- Dworkin SI, Stairs DJ (2003) Self-administration of drugs of abuse. In: *Methods in drug abuse research: cellular and circuit level analyses*, CRC Press LLC Edition, pp 16-51.

-E-

- Ennulat DJ, Babb S, Cohen BM (1994) Persistent reduction of immediate early gene mRNA in rat forebrain following single or multiple doses of cocaine. *Brain Res Mol Brain Res* 26:106-112.
- Everitt BJ, Robbins TW (2005) Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nat Neurosci* 8:1481-1489.

-F-

- Fan S, Zhang MQ, Zhang X (2008) Histone methylation marks play important roles in predicting the methylation status of CpG islands. *Biochem Biophys Res Commun* 374:559-564.
- Fatemi SH (2001) Reelin mutations in mouse and man: from reeler mouse to schizophrenia, mood disorders, autism and lissencephaly. *Mol Psychiatry* 6:129-133.
- Filip M, Frankowska M, Zaniowska M, Golda A, Przegalinski E (2005) The serotonergic system and its role in cocaine addiction. *Pharmacol Rep* 57:685-700.
- Fischle W, Tseng BS, Dormann HL, Ueberheide BM, Garcia BA, Shabanowitz J, Hunt DF, Funabiki H, Allis CD (2005) Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature* 438:1116-1122.
- Fleming JA, Byck R, Barash PG (1990) Pharmacology and therapeutic applications of cocaine. *Anesthesiology* 73:518-531.
- Fletcher PJ, Grottick AJ, Higgins GA (2002) Differential effects of the 5-HT(2A) receptor antagonist M100907 and the 5-HT(2C) receptor antagonist SB242084 on cocaine-induced locomotor activity, cocaine self-administration and cocaine-induced reinstatement of responding. *Neuropsychopharmacology* 27:576-586.
- Florin SM, Kuczenski R, Segal DS (1994) Regional extracellular norepinephrine responses to amphetamine and cocaine and effects of clonidine pretreatment. *Brain Res* 654:53-62.
- Foote SL, Bloom FE, Aston-Jones G (1983) Nucleus locus ceruleus: new evidence of anatomical and physiological specificity. *Physiol Rev* 63:844-914.
- Foster JD, Cervinski MA, Gorentla BK, Vaughan RA (2006) Regulation of the dopamine transporter by phosphorylation. *Handb Exp Pharmacol*:197-214.
- Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, Heine-Suner D, Cigudosa JC, Urioste M, Benitez J, Boix-Chornet M, Sanchez-Aguilera A, Ling C, Carlsson E, Poulsen P, Vaag A, Stephan Z, Spector TD, Wu YZ, Plass C, Esteller M (2005) Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:10604-10609.
- Franklin SG, Zweidler A (1977) Non-allelic variants of histones 2a, 2b and 3 in mammals. *Nature* 266:273-275.
- Fremeau RT, Jr., Duncan GE, Fornaretto MG, Dearry A, Gingrich JA, Breese GR, Caron MG (1991) Localization of D1 dopamine receptor mRNA in brain supports a role in cognitive, affective, and neuroendocrine aspects of dopaminergic neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:3772-3776.
- Freund S (1884) Über Coca. *Wiener Zentralblatt für die gesamte therapie* 2:289-314.
- 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.
- Fukuchi M, Nii T, Ishimaru N, Minamino A, Hara D, Takasaki I, Tabuchi A, Tsuda M (2009) Valproic acid induces up- or down-regulation of gene expression responsible for the neuronal excitation and inhibition in rat cortical neurons through its epigenetic actions. *Neurosci Res* 65:35-43.
- Fulco M, Schiltz RL, Iezzi S, King MT, Zhao P, Kashiwaya Y, Hoffman E, Veech RL, Sartorelli V (2003) Sir2 regulates skeletal muscle differentiation as a potential sensor of the redox state. *Mol Cell* 12:51-62.
- Furumai R, Komatsu Y, Nishino N, Khochbin S, Yoshida M, Horinouchi S (2001) Potent histone deacetylase inhibitors built from trichostatin A and cyclic tetrapeptide antibiotics including trapoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:87-92.

-G-

- Gao L, Cueto MA, Asselbergs F, Atadja P (2002) Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *J Biol Chem* 277:25748-25755.
- Gardiner-Garden M, Frommer M (1987) CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* 196:261-282.
- Gauvin DV, Moore KR, Holloway FA (1993) Do rat strain differences in ethanol consumption reflect differences in ethanol sensitivity or the preparedness to learn? *Alcohol* 10:37-43.
- Ghasemzadeh MB, Nelson LC, Lu XY, Kalivas PW (1999) Neuroadaptations in ionotropic and metabotropic glutamate receptor mRNA produced by cocaine treatment. *J Neurochem* 72:157-165.

- Gibbs ME, Summers RJ (2002) Role of adrenoceptor subtypes in memory consolidation. *Prog Neurobiol* 67:345-391.
- Giordano A, Avantaggiati ML (1999) p300 and CBP: partners for life and death. *J Cell Physiol* 181:218-230.
- Glozak MA, Sengupta N, Zhang X, Seto E (2005) Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene* 363:15-23.
- Gobert A, Lejeune F, Rivet JM, Cistarelli L, Millan MJ (1996) Dopamine D3 (auto) receptors inhibit dopamine release in the frontal cortex of freely moving rats in vivo. *J Neurochem* 66:2209-2212.
- Goeders NE, McNulty MA, Mirkis S, McAllister KH (1989) Chlordiazepoxide alters intravenous cocaine self-administration in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 33:859-866.
- Gold MS (1992) Cocaine and Crack. In: Lowinson J.H., Ruiz P., Millman R.B., Substance Abuse: a comprehensive textbook, pp 205-221. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Goldberg AL (2003) Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* 426:895-899.
- Goldstein A, Tachibana S, Lowney LI, Hunkapiller M, Hood L (1979) Dynorphin-(1-13), an extraordinarily potent opioid peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:6666-6670.
- Gonzalez-Romero R, Mendez J, Ausio J, Eirin-Lopez JM (2008) Quickly evolving histones, nucleosome stability and chromatin folding: all about histone H2A.Bbd. *Gene* 413:1-7.
- Grabowski J, Rhoades H, Schmitz J, Stotts A, Daruzska LA, Creson D, Moeller FG (2001) Dextroamphetamine for cocaine-dependence treatment: a double-blind randomized clinical trial. *J Clin Psychopharmacol* 21:522-526.
- Graybiel AM, Moratalla R, Robertson HA (1990) Amphetamine and cocaine induce drug-specific activation of the c-fos gene in striosome-matrix compartments and limbic subdivisions of the striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:6912-6916.
- Greer M, Williams CM (1963) Dopamine metabolism in Parkinson's disease. *Neurology* 13:73-76.
- Gregoret IV, Lee YM, Goodson HV (2004) Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *J Mol Biol* 338:17-31.
- Grewal SI, Elgin SC (2002) Heterochromatin: new possibilities for the inheritance of structure. *Curr Opin Genet Dev* 12:178-187.
- Griffiths RR, Brady JV, Snell JD (1978) Progressive-ratio performance maintained by drug infusions: comparison of cocaine, diethylpropion, chlorphentermine, and fenfluramine. *Psychopharmacology (Berl)* 56:5-13.
- Grimm JW, Hope BT, Wise RA, Shaham Y (2001) Neuroadaptation. Incubation of cocaine craving after withdrawal. *Nature* 412:141-142.
- Grossman A, Clement-Jones V (1983) Opiate receptors: enkephalins and endorphins. *Clin Endocrinol Metab* 12:31-56.
- Grottick AJ, Fletcher PJ, Higgins GA (2000) Studies to investigate the role of 5-HT(2C) receptors on cocaine- and food-maintained behavior. *J Pharmacol Exp Ther* 295:1183-1191.
- Grozinger CM, Schreiber SL (2000) Regulation of histone deacetylase 4 and 5 and transcriptional activity by 14-3-3-dependent cellular localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:7835-7840.
- Grubisha O, Smith BC, Denu JM (2005) Small molecule regulation of Sir2 protein deacetylases. *Febs J* 272:4607-4616.
- Gruen RJ, Friedhoff AJ, Coale A, Moghaddam B (1992) Tonic inhibition of striatal dopamine transmission: effects of benzodiazepine and GABAA receptor antagonists on extracellular dopamine levels. *Brain Res* 599:51-56.
- Guan Z, Giustetto M, Lomvardas S, Kim JH, Miniaci MC, Schwartz JH, Thanos D, Kandel ER (2002) Integration of long-term-memory-related synaptic plasticity involves bidirectional regulation of gene expression and chromatin structure. *Cell* 111:483-493.
- Guenther MG, Barak O, Lazar MA (2001) The SMRT and N-CoR corepressors are activating cofactors for histone deacetylase 3. *Mol Cell Biol* 21:6091-6101.

-H-

- Haber SN, Fudge JL (1997) The primate substantia nigra and VTA: integrative circuitry and function. *Crit Rev Neurobiol* 11:323-342.
- Haberland M, Montgomery RL, Olson EN (2009) The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat Rev Genet* 10:32-42.
- Haddah LM, Winchester JF (1990) Clinical management of poisoning and drug overdose, 2th Edition. Philadelphia: WB Saunders Compagny Inc.
- Hajnal A, Norgren R (2001) Accumbens dopamine mechanisms in sucrose intake. *Brain Res* 904:76-84.

- Hake SB, Allis CD (2006) Histone H3 variants and their potential role in indexing mammalian genomes: the "H3 barcode hypothesis". *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:6428-6435.
- Happel N, Doenecke D (2009) Histone H1 and its isoforms: contribution to chromatin structure and function. *Gene* 431:1-12.
- Haque FN, Gottesman, II, Wong AH (2009) Not really identical: epigenetic differences in monozygotic twins and implications for twin studies in psychiatry. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 151C:136-141.
- Harris GC, Hedaya MA, Pan WJ, Kalivas P (1996) beta-adrenergic antagonism alters the behavioral and neurochemical responses to cocaine. *Neuropsychopharmacology* 14:195-204.
- Hassa PO, Hottiger MO (2005) An epigenetic code for DNA damage repair pathways? *Biochem Cell Biol* 83:270-285.
- Hassa PO, Haenni SS, Elser M, Hottiger MO (2006) Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going? *Microbiol Mol Biol Rev* 70:789-829.
- Hassan YI, Zempleni J (2008) A novel, enigmatic histone modification: biotinylation of histones by holocarboxylase synthetase. *Nutr Rev* 66:721-725.
- Hendrich B, Bird A (1998) Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol* 18:6538-6547.
- Herrera DG, Robertson HA (1996) Activation of c-fos in the brain. *Prog Neurobiol* 50:83-107.
- Hodos W (1961) Progressive ratio as a measure of reward strength. *Science* 134:943-944.
- Hoffmeister F (1979) Progressive-ratio performance in the rhesus monkey maintained by opiate infusions. *Psychopharmacology (Berl)* 62:181-186.
- Hope BT, Nye HE, Kelz MB, Self DW, Iadarola MJ, Nakabeppu Y, Duman RS, Nestler EJ (1994) Induction of a long-lasting AP-1 complex composed of altered Fos-like proteins in brain by chronic cocaine and other chronic treatments. *Neuron* 13:1235-1244.
- Horiuchi A, Takeyasu K, Mouradian MM, Jose PA, Felder RA (1993) D1A dopamine receptor stimulation inhibits Na⁺/K⁺-ATPase activity through protein kinase A. *Mol Pharmacol* 43:281-285.
- Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, Sinclair DA (2003) Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 425:191-196.
- Hsu JY, Sun ZW, Li X, Reuben M, Tatchell K, Bishop DK, Grushcow JM, Brame CJ, Caldwell JA, Hunt DF, Lin R, Smith MM, Allis CD (2000) Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell* 102:279-291.
- Hu E, Dul E, Sung CM, Chen Z, Kirkpatrick R, Zhang GF, Johanson K, Liu R, Lago A, Hofmann G, Macarron R, de los Frailes M, Perez P, Krawiec J, Winkler J, Jaye M (2003) Identification of novel isoform-selective inhibitors within class I histone deacetylases. *J Pharmacol Exp Ther* 307:720-728.
- Hubbert C, Guardiola A, Shao R, Kawaguchi Y, Ito A, Nixon A, Yoshida M, Wang XF, Yao TP (2002) HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* 417:455-458.
- 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.
- 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.
- Hyman SE, Cole RL, Konradi C, Kosofsky BE (1995) Dopamine regulation of transcription factor-target interactions in rat striatum. *Chem Senses* 20:257-260.

-|-

- Ikemoto S (2007) Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex. *Brain Res Rev* 56:27-78.
- Illingworth R, Kerr A, Desousa D, Jorgensen H, Ellis P, Stalker J, Jackson D, Clee C, Plumb R, Rogers J, Humphray S, Cox T, Langford C, Bird A (2008) A novel CpG island set identifies tissue-specific methylation at developmental gene loci. *PLoS Biol* 6:e22.
- Imai S, Armstrong CM, Kaerberlein M, Guarente L (2000) Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* 403:795-800.
- Impagnatiello F, Guidotti AR, Pesold C, Dwivedi Y, Caruncho H, Pisu MG, Uzunov DP, Smalheiser NR, Davis JM, Pandey GN, Pappas GD, Tueting P, Sharma RP, Costa E (1998) A decrease of reelin expression as a putative vulnerability factor in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15718-15723.
- Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, Speed TP (2003) Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res* 31:e15.
- Issa JP (1999) Aging, DNA methylation and cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 32:31-43.

-J-

- Jaber M, Robinson SW, Missale C, Caron MG (1996) Dopamine receptors and brain function. *Neuropharmacology* 35:1503-1519.
- Jacobs BL, Azmitia EC (1992) Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev* 72:165-229.
- Jasmin L, Narasaiah M, Tien D (2006) Noradrenaline is necessary for the hedonic properties of addictive drugs. *Vascul Pharmacol* 45:243-250.
- 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.
- Jedynak JP, Ali SF, Haycock JW, Hope BT (2002) Acute administration of cocaine regulates the phosphorylation of serine-19, -31 and -40 in tyrosine hydroxylase. *J Neurochem* 82:382-388.
- Jenab S, Festa ED, Nazarian A, Wu HB, Sun WL, Hazim R, Russo SJ, Quinones-Jenab V (2005) Cocaine induction of ERK proteins in dorsal striatum of Fischer rats. *Brain Res Mol Brain Res* 142:134-138.
- Jenuwein T, Allis CD (2001) Translating the histone code. *Science* 293:1074-1080.
- Jordan C, Li HH, Kwan HC, Francke U (2007) Cerebellar gene expression profiles of mouse models for Rett syndrome reveal novel MeCP2 targets. *BMC Med Genet* 8:36.
- Jouvert P, Dietrich JB, Aunis D, Zwiller J (2002) Differential rat brain expression of EGR proteins and of the transcriptional corepressor NAB in response to acute or chronic cocaine administration. *Neuromolecular Med* 1:137-151.
- Jung BJ, Dawson R, Jr., Sealey SA, Peris J (1999) Endogenous GABA release is reduced in the striatum of cocaine-sensitized rats. *Synapse* 34:103-110.

-K-

- Kalda A, Heidmets LT, Shen HY, Zharkovsky A, Chen JF (2007) Histone deacetylase inhibitors modulates the induction and expression of amphetamine-induced behavioral sensitization partially through an associated learning of the environment in mice. *Behav Brain Res* 181:76-84.
- Kalivas PW, Duffy P (1995) D1 receptors modulate glutamate transmission in the ventral tegmental area. *J Neurosci* 15:5379-5388.
- Kalivas PW, Sorg BA, Hooks MS (1993) The pharmacology and neural circuitry of sensitization to psychostimulants. *Behav Pharmacol* 4:315-334.
- 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.
- Kanazawa I, Emson PC, Cuello AC (1977) Evidence for the existence of substance P-containing fibres in striato-nigral and pallido-nigral pathways in rat brain. *Brain Res* 119:447-453.
- Kao HY, Verdel A, Tsai CC, Simon C, Juguilon H, Khochbin S (2001) Mechanism for nucleocytoplasmic shuttling of histone deacetylase 7. *J Biol Chem* 276:47496-47507.
- Karamboulas C, Swedani A, Ward C, Al-Madhoun AS, Wilton S, Boisvenue S, Ridgeway AG, Skerjanc IS (2006) HDAC activity regulates entry of mesoderm cells into the cardiac muscle lineage. *J Cell Sci* 119:4305-4314.
- Kebabian JW, Beaulieu M, Itoh Y (1984) Pharmacological and biochemical evidence for the existence of two categories of dopamine receptor. *Can J Neurol Sci* 11:114-117.
- Killam EK, Killam KF, Shaw T (1957) The effects of psychotherapeutic compounds on central afferent and limbic pathways. *Ann N Y Acad Sci* 66:784-805.
- Kilty JE, Lorang D, Amara SG (1991) Cloning and expression of a cocaine-sensitive rat dopamine transporter. *Science* 254:578-579.
- Kim B, Rincon Castro LM, Jawed S, Niles LP (2008a) Clinically relevant concentrations of valproic acid modulate melatonin MT(1) receptor, HDAC and MeCP2 mRNA expression in C6 glioma cells. *Eur J Pharmacol* 589:45-48.
- Kim MA, Kim HJ, Brown AL, Lee MY, Bae YS, Park JI, Kwak JY, Chung JH, Yun J (2007) Identification of novel substrates for human checkpoint kinase Chk1 and Chk2 through genome-wide screening using a consensus Chk phosphorylation motif. *Exp Mol Med* 39:205-212.
- Kim WY, Kim S, Kim JH (2008b) Chronic microinjection of valproic acid into the nucleus accumbens attenuates amphetamine-induced locomotor activity. *Neurosci Lett* 432:54-57.
- Kingston RE, Narlikar GJ (1999) ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev* 13:2339-2352.
- Kitayama S, Shimada S, Xu H, Markham L, Donovan DM, Uhl GR (1992) Dopamine transporter site-directed mutations differentially alter substrate transport and cocaine binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:7782-7785.

- Klose RJ, Bird AP (2006) Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci* 31:89-97.
- Koob GF (2008) A role for brain stress systems in addiction. *Neuron* 59:11-34.
- Koob GF, Bloom FE (1988) Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. *Science* 242:715-723.
- Koob GF, Le Moal M (1997) Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science* 278:52-58.
- Koob GF, Le Moal M (2001) Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology* 24:97-129.
- Koob GF, Le Moal M (2008) Addiction and the brain antireward system. *Annual Review of Psychology* 59:29-53.
- Kornberg RD (1977) Structure of chromatin. *Annu Rev Biochem* 46:931-954.
- Korzus E, Rosenfeld MG, Mayford M (2004) CBP histone acetyltransferase activity is a critical component of memory consolidation. *Neuron* 42:961-972.
- Koshland D, Strunnikov A (1996) Mitotic chromosome condensation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:305-333.
- Kosten TR, Rosen M, Bond J, Settles M, Roberts JS, Shields J, Jack L, Fox B (2002) Human therapeutic cocaine vaccine: safety and immunogenicity. *Vaccine* 20:1196-1204.
- Kouzarides T (2002) Histone methylation in transcriptional control. *Curr Opin Genet Dev* 12:198-209.
- Kouzarides T (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* 128:693-705.
- Kovacs JJ, Murphy PJ, Gaillard S, Zhao X, Wu JT, Nicchitta CV, Yoshida M, Toft DO, Pratt WB, Yao TP (2005) HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor. *Mol Cell* 18:601-607.
- Kreiss DS, Bergstrom DA, Gonzalez AM, Huang KX, Sibley DR, Walters JR (1995) Dopamine receptor agonist potencies for inhibition of cell firing correlate with dopamine D3 receptor binding affinities. *Eur J Pharmacol* 277:209-214.
- Kumar A, Choi KH, Renthall W, Tsankova NM, Theobald DE, Truong HT, Russo SJ, Laplant Q, Sasaki TS, Whistler KN, Neve RL, Self DW, Nestler EJ (2005) Chromatin remodeling is a key mechanism underlying cocaine-induced plasticity in striatum. *Neuron* 48:303-314.
- 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-

- Laborda J (1991) 36B4 cDNA used as an estradiol-independent mRNA control is the cDNA for human acidic ribosomal phosphoprotein PO. *Nucleic Acids Res* 19:3998.
- Lalande M (1996) Parental imprinting and human disease. *Annu Rev Genet* 30:173-195.
- Lan F, Nottke AC, Shi Y (2008) Mechanisms involved in the regulation of histone lysine demethylases. *Curr Opin Cell Biol* 20:316-325.
- Lanca AJ, De Cabo C, Arifuzzaman AI, Vaccarino FJ (1998) Cholecystokinergic innervation of nucleus accumbens subregions. *Peptides* 19:859-868.
- Lang UE, Sander T, Lohoff FW, Hellweg R, Bajbouj M, Winterer G, Gallinat J (2007) Association of the met66 allele of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) with smoking. *Psychopharmacology (Berl)* 190:433-439.
- Larsen F, Gundersen G, Lopez R, Prydz H (1992) CpG islands as gene markers in the human genome. *Genomics* 13:1095-1107.
- Le Foll B, Goldberg SR (2005) Nicotine induces conditioned place preferences over a large range of doses in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 178:481-492.
- Le Moine C, Bloch B (1995) D1 and D2 dopamine receptor gene expression in the rat striatum: sensitive cRNA probes demonstrate prominent segregation of D1 and D2 mRNAs in distinct neuronal populations of the dorsal and ventral striatum. *J Comp Neurol* 355:418-426.
- Le Moine C, Gaspar P (1998) Subpopulations of cortical GABAergic interneurons differ by their expression of D1 and D2 dopamine receptor subtypes. *Brain Res Mol Brain Res* 58:231-236.
- Lebeau B (2006) Cocaine: de la mythologie à la consommation de masse. *Revue Toxicbase*.
- Lee JS, Shukla A, Schneider J, Swanson SK, Washburn MP, Florens L, Bhaumik SR, Shilatifard A (2007) Histone crosstalk between H2B monoubiquitination and H3 methylation mediated by COMPASS. *Cell* 131:1084-1096.
- Lehrmann E, Colantuoni C, Deep-Soboslay A, Becker KG, Lowe R, Huestis MA, Hyde TM, Kleinman JE, Freed WJ (2006) Transcriptional changes common to human cocaine, cannabis and phencyclidine abuse. *PLoS One* 1:e114.
- 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.

- Lesscher HM, Hoogveld E, Burbach JP, van Ree JM, Gerrits MA (2005) Endogenous cannabinoids are not involved in cocaine reinforcement and development of cocaine-induced behavioural sensitization. *Eur Neuropsychopharmacol* 15:31-37.
- Levenson JM, Sweatt JD (2006) Epigenetic mechanisms: a common theme in vertebrate and invertebrate memory formation. *Cell Mol Life Sci* 63:1009-1016.
- Levenson JM, Qiu S, Weeber EJ (2008) The role of reelin in adult synaptic function and the genetic and epigenetic regulation of the reelin gene. *Biochim Biophys Acta* 1779:422-431.
- Levenson JM, O'Riordan KJ, Brown KD, Trinh MA, Molfese DL, Sweatt JD (2004) Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *J Biol Chem* 279:40545-40559.
- Levine AS, Kotz CM, Gosnell BA (2003) Sugars: hedonic aspects, neuroregulation, and energy balance. *Am J Clin Nutr* 78:834S-842S.
- Levitt P, Harvey JA, Friedman E, Simansky K, Murphy EH (1997) New evidence for neurotransmitter influences on brain development. *Trends Neurosci* 20:269-274.
- Levitzki A (1986) Beta-adrenergic receptors and their mode of coupling to adenylate cyclase. *Physiol Rev* 66:819-854.
- Li E (2002) Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet* 3:662-673.
- Li J, Olinger AB, Dassow MS, Abel MS (2003) Up-regulation of GABA(B) receptor mRNA and protein in the hippocampus of cocaine- and lidocaine-kindled rats. *Neuroscience* 118:451-462.
- Li JX, Zhang Q, Liang JH (2004) Valproate prevents the induction, but not the expression of morphine sensitization in mice. *Behav Brain Res* 152:251-257.
- Li JX, Han R, Deng YP, Chen SQ, Liang JH (2005) Different effects of valproate on methamphetamine- and cocaine-induced behavioral sensitization in mice. *Behav Brain Res* 161:125-132.
- Lichtenfeld PJ, Rubin DB, Feldman RS (1984) Subarachnoid hemorrhage precipitated by cocaine snorting. *Arch Neurol* 41:223-224.
- Lin CW, Miller TR, Witte DG, Bianchi BR, Stashko M, Manelli AM, Frail DE (1995) Characterization of cloned human dopamine D1 receptor-mediated calcium release in 293 cells. *Mol Pharmacol* 47:131-139.
- Lindner HH (2008) Analysis of histones, histone variants, and their post-translationally modified forms. *Electrophoresis* 29:2516-2532.
- Ling W, Shoptaw S, Majewska D (1998) Baclofen as a cocaine anti-craving medication: a preliminary clinical study. *Neuropsychopharmacology* 18:403-404.
- Linseman DA, Bartley CM, Le SS, Laessig TA, Bouchard RJ, Meintzer MK, Li M, Heidenreich KA (2003) Inactivation of the myocyte enhancer factor-2 repressor histone deacetylase-5 by endogenous Ca(2+) //calmodulin-dependent kinase II promotes depolarization-mediated cerebellar granule neuron survival. *J Biol Chem* 278:41472-41481.
- Liszt G, Ford E, Kurtev M, Guarente L (2005) Mouse Sir2 homolog SIRT6 is a nuclear ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem* 280:21313-21320.
- Liu Y, Edwards RH (1997) The role of vesicular transport proteins in synaptic transmission and neural degeneration. *Annu Rev Neurosci* 20:125-156.
- Liu Y, Roberts DC, Morgan D (2005) Sensitization of the reinforcing effects of self-administered cocaine in rats: effects of dose and intravenous injection speed. *Eur J Neurosci* 22:195-200.
- Lopez-Serra L, Esteller M (2008) Proteins that bind methylated DNA and human cancer: reading the wrong words. *Br J Cancer* 98:1881-1885.
- Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389:251-260.

-M-

- Macdonald RL, Olsen RW (1994) GABAA receptor channels. *Annu Rev Neurosci* 17:569-602.
- Mai A, Massa S, Rotili D, Cerbara I, Valente S, Pezzi R, Simeoni S, Ragno R (2005) Histone deacetylation in epigenetics: an attractive target for anticancer therapy. *Med Res Rev* 25:261-309.
- Maisonneuve IM, Keller RW, Glick SD (1990) Similar effects of D-amphetamine and cocaine on extracellular dopamine levels in medial prefrontal cortex of rats. *Brain Res* 535:221-226.
- Maldonado R, Valverde O, Berrendero F (2006) Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction. *Trends Neurosci* 29:225-232.
- Malgaroli A, Vallar L, Elahi FR, Pozzan T, Spada A, Meldolesi J (1987) Dopamine inhibits cytosolic Ca²⁺ increases in rat lactotroph cells. Evidence of a dual mechanism of action. *J Biol Chem* 262:13920-13927.

- Malvaez M, Sanchis-Segura C, Vo D, Lattal KM, Wood MA (2010) Modulation of chromatin modification facilitates extinction of cocaine-induced conditioned place preference. *Biol Psychiatry* 67:36-43.
- Mann BS, Johnson JR, Cohen MH, Justice R, Pazdur R (2007) FDA approval summary: vorinostat for treatment of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma. *Oncologist* 12:1247-1252.
- Marks P, Rifkind RA, Richon VM, Breslow R, Miller T, Kelly WK (2001) Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat Rev Cancer* 1:194-202.
- Marks PA, Miller T, Richon VM (2003) Histone deacetylases. *Curr Opin Pharmacol* 3:344-351.
- Marmorstein R (2001) Structure of histone deacetylases: insights into substrate recognition and catalysis. *Structure* 9:1127-1133.
- Martellotta MC, Cossu G, Fattore L, Gessa GL, Fratta W (1998) Intravenous self-administration of gamma-hydroxybutyric acid in drug-naïve mice. *Eur Neuropsychopharmacol* 8:293-296.
- Martin C, Zhang Y (2005) The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:838-849.
- Martin KF, Hannon S, Phillips I, Heal DJ (1992) Opposing roles for 5-HT1B and 5-HT3 receptors in the control of 5-HT release in rat hippocampus in vivo. *Br J Pharmacol* 106:139-142.
- Martin M, Kettmann R, Dequiedt F (2007) Class IIa histone deacetylases: regulating the regulators. *Oncogene* 26:5450-5467.
- Martinez I, Paredes RG (2001) Only self-paced mating is rewarding in rats of both sexes. *Horm Behav* 40:510-517.
- Marushige K (1976) Activation of chromatin by acetylation of histone side chains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:3937-3941.
- Matsuzaki H, Minabe Y, Nakamura K, Suzuki K, Iwata Y, Sekine Y, Tsuchiya KJ, Sugihara G, Suda S, Takei N, Nakahara D, Hashimoto K, Nairn AC, Mori N, Sato K (2007) Disruption of reelin signaling attenuates methamphetamine-induced hyperlocomotion. *Eur J Neurosci* 25:3376-3384.
- Mattson BJ, Koya E, Simmons DE, Mitchell TB, Berkow A, Crombag HS, Hope BT (2008) Context-specific sensitization of cocaine-induced locomotor activity and associated neuronal ensembles in rat nucleus accumbens. *Eur J Neurosci* 27:202-212.
- Maze I, Covington HE, 3rd, Dietz DM, LaPlant Q, Renthal W, Russo SJ, Mechanic M, Mouzon E, Neve RL, Haggarty SJ, Ren Y, Sampath SC, Hurd YL, Greengard P, Tarakhovskiy A, Schaefer A, Nestler EJ (2010) Essential role of the histone methyltransferase G9a in cocaine-induced plasticity. *Science* 327:213-216.
- McGeehan AJ, Olive MF (2003) The mGluR5 antagonist MPEP reduces the conditioned rewarding effects of cocaine but not other drugs of abuse. *Synapse* 47:240-242.
- McGhee JD, Felsenfeld G (1980) Nucleosome structure. *Annu Rev Biochem* 49:1115-1156.
- McGowan PO, Sasaki A, D'Alessio AC, Dymov S, Labonte B, Szyf M, Turecki G, Meaney MJ (2009) Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nat Neurosci* 12:342-348.
- McKinsey TA, Zhang CL, Lu J, Olson EN (2000) Signal-dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation. *Nature* 408:106-111.
- Melchior F (2000) SUMO--nonclassical ubiquitin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:591-626.
- Mello NK, Mendelson JH, Bree MP, Lukas SE (1989) Buprenorphine suppresses cocaine self-administration by rhesus monkeys. *Science* 245:859-862.
- Meredith GE (1999) The synaptic framework for chemical signaling in nucleus accumbens. *Ann N Y Acad Sci* 877:140-156.
- Michishita E, McCord RA, Berber E, Kioi M, Padilla-Nash H, Damian M, Cheung P, Kusumoto R, Kawahara TL, Barrett JC, Chang HY, Bohr VA, Ried T, Gozani O, Chua KF (2008) SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin. *Nature* 452:492-496.
- Millenaar FF, Okyere J, May ST, van Zanten M, Voesenek LA, Peeters AJ (2006) How to decide? Different methods of calculating gene expression from short oligonucleotide array data will give different results. *BMC Bioinformatics* 7:137.
- Miller CA, Sweatt JD (2007) Covalent modification of DNA regulates memory formation. *Neuron* 53:857-869.
- Miller TA, Witter DJ, Belvedere S (2003) Histone deacetylase inhibitors. *J Med Chem* 46:5097-5116.
- Misgeld U, Bijak M, Jarolimek W (1995) A physiological role for GABAB receptors and the effects of baclofen in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 46:423-462.
- Mitsiades CS, Mitsiades NS, McMullan CJ, Poulaki V, Shringarpure R, Hideshima T, Akiyama M, Chauhan D, Munshi N, Gu X, Bailey C, Joseph M, Libermann TA, Richon VM, Marks PA, Anderson KC (2004) Transcriptional signature of histone deacetylase inhibition in multiple myeloma: biological and clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:540-545.
- Mogenson GJ, Jones DL, Yim CY (1980) From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. *Prog Neurobiol* 14:69-97.

- Moggs JG, Grandi P, Quivy JP, Jonsson ZO, Hubscher U, Becker PB, Almouzni G (2000) A CAF-1-PCNA-mediated chromatin assembly pathway triggered by sensing DNA damage. *Mol Cell Biol* 20:1206-1218.
- Molinoff PB, Axelrod J (1971) Biochemistry of catecholamines. *Annu Rev Biochem* 40:465-500.
- Monsma FJ, Jr., McVittie LD, Gerfen CR, Mahan LC, Sibley DR (1989) Multiple D2 dopamine receptors produced by alternative RNA splicing. *Nature* 342:926-929.
- Moore RY, Bloom FE (1979) Central catecholamine neuron systems: anatomy and physiology of the norepinephrine and epinephrine systems. *Annu Rev Neurosci* 2:113-168.
- Moratalla R, Robertson HA, Graybiel AM (1992) Dynamic regulation of NGFI-A (zif268, egr1) gene expression in the striatum. *J Neurosci* 12:2609-2622.
- Moreira JM, Scheipers P, Sorensen P (2003) The histone deacetylase inhibitor Trichostatin A modulates CD4+ T cell responses. *BMC Cancer* 3:30.
- Morgan JI, Curran T (1991) Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Neurosci* 14:421-451.
- Motta MC, Divecha N, Lemieux M, Kamel C, Chen D, Gu W, Bultsma Y, McBurney M, Guarente L (2004) Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors. *Cell* 116:551-563.
- Mu P, Yu LC (2007) Valproic acid sodium inhibits the morphine-induced conditioned place preference in the central nervous system of rats. *Neurosci Lett* 426:135-138.

-N-

- Nairn AC, Svenningsson P, Nishi A, Fisone G, Girault JA, Greengard P (2004) The role of DARPP-32 in the actions of drugs of abuse. *Neuropharmacology* 47 Suppl 1:14-23.
- Nakada S, Chen GI, Gingras AC, Durocher D (2008) PP4 is a gamma H2AX phosphatase required for recovery from the DNA damage checkpoint. *EMBO Rep* 9:1019-1026.
- Nakanishi S, Nakajima Y, Masu M, Ueda Y, Nakahara K, Watanabe D, Yamaguchi S, Kawabata S, Okada M (1998) Glutamate receptors: brain function and signal transduction. *Brain Res Brain Res Rev* 26:230-235.
- Nan X, 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.
- Narlikar GJ, Fan HY, Kingston RE (2002) Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* 108:475-487.
- Nathan D, Sterner DE, Berger SL (2003) Histone modifications: Now summoning sumoylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:13118-13120.
- Nathan D, Ingvarsdottir K, Sterner DE, Bylebyl GR, Dokmanovic M, Dorsey JA, Whelan KA, Krsmanovic M, Lane WS, Meluh PB, Johnson ES, Berger SL (2006) Histone sumoylation is a negative regulator in *Saccharomyces cerevisiae* and shows dynamic interplay with positive-acting histone modifications. *Genes Dev* 20:966-976.
- Nebbioso A, Manzo F, Miceli M, Conte M, Manente L, Baldi A, De Luca A, Rotili D, Valente S, Mai A, Usiello A, Gronemeyer H, Altucci L (2009) Selective class II HDAC inhibitors impair myogenesis by modulating the stability and activity of HDAC-MEF2 complexes. *EMBO Rep* 10:776-782.
- Nelson DL (2004) 5-HT₅ receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 3:53-58.
- Nestler EJ (2001) Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat Rev Neurosci* 2:119-128.
- Ng SS, Yue WW, Oppermann U, Klose RJ (2009) Dynamic protein methylation in chromatin biology. *Cell Mol Life Sci* 66:407-422.
- Niemann A (1860) Über eine neue organische Base in den Cocablättern. *Archiv der Pharmazie* 153:129-155.
- Noh JS, Sharma RP, Veldic M, Salvacion AA, Jia X, Chen Y, Costa E, Guidotti A, Grayson DR (2005) DNA methyltransferase 1 regulates reelin mRNA expression in mouse primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:1749-1754.
- North BJ, Marshall BL, Borra MT, Denu JM, Verdin E (2003) The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase. *Mol Cell* 11:437-444.
- Nowak SJ, Corces VG (2004) Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends Genet* 20:214-220.
- Numachi Y, Yoshida S, Yamashita M, Fujiyama K, Naka M, Matsuoka H, Sato M, Sora I (2004) Psychostimulant alters expression of DNA methyltransferase mRNA in the rat brain. *Ann N Y Acad Sci* 1025:102-109.

-O-

- Observatoire Européen des Drogues et des Toxicomanies (2009) Rapport Annuel, état du phénomène de la drogue en Europe.
- Observatoire Français des Drogues et des Toxicomanies, ed (2010) Les usages de drogues illicites en France depuis 1999.
- Olds J, Milner P (1954) Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J Comp Physiol Psychol* 47:419-427.
- Olive MF, Koenig HN, Nannini MA, Hodge CW (2001) Stimulation of endorphin neurotransmission in the nucleus accumbens by ethanol, cocaine, and amphetamine. *J Neurosci* 21:RC184.
- Olsen RW (2002) GABA. In: *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*, pp 159-168. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Onali P, Olanas MC (1989) Involvement of adenylate cyclase inhibition in dopamine autoreceptor regulation of tyrosine hydroxylase in rat nucleus accumbens. *Neurosci Lett* 102:91-96.
- Organisation Mondiale de la Santé (1992) Classification statistique internationale des maladies et des problèmes de santé connexes, 10th Edition.

-P-

- Pandey SC, Ugale R, Zhang H, Tang L, Prakash A (2008) Brain chromatin remodeling: a novel mechanism of alcoholism. *J Neurosci* 28:3729-3737.
- Parker LA (1996) LSD produces place preference and flavor avoidance but does not produce flavor aversion in rats. *Behav Neurosci* 110:503-508.
- Parra M, Mahmoudi T, Verdin E (2007) Myosin phosphatase dephosphorylates HDAC7, controls its nucleocytoplasmic shuttling, and inhibits apoptosis in thymocytes. *Genes Dev* 21:638-643.
- Parsons LH, Smith AD, Justice JB, Jr. (1991) Basal extracellular dopamine is decreased in the rat nucleus accumbens during abstinence from chronic cocaine. *Synapse* 9:60-65.
- Parsons LH, Koob GF, Weiss F (1996) Extracellular serotonin is decreased in the nucleus accumbens during withdrawal from cocaine self-administration. *Behav Brain Res* 73:225-228.
- Parsons LH, Weiss F, Koob GF (1998) Serotonin_{1B} receptor stimulation enhances cocaine reinforcement. *J Neurosci* 18:10078-10089.
- Pascual-Leone A, Dhuna A, Anderson DC (1991) Cerebral atrophy in habitual cocaine abusers: a planimetric CT study. *Neurology* 41:34-38.
- Pascual M, Pastor V, Bernabeu R (2009) Nicotine-conditioned place preference induced CREB phosphorylation and Fos expression in the adult rat brain. *Psychopharmacology* 207:57-71.
- Passarge E (1979) Emil Heitz and the concept of heterochromatin: longitudinal chromosome differentiation was recognized fifty years ago. *Am J Hum Genet* 31:106-115.
- Paxinos G, Watson C (1997) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: CA: Academic.
- Pearl MJ, Smyth GK, van Laar RK, Bowtell DD, Richon VM, Marks PA, Holloway AJ, Johnstone RW (2005) Identification and functional significance of genes regulated by structurally different histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:3697-3702.
- Pehrson JR, Fried VA (1992) MacroH2A, a core histone containing a large nonhistone region. *Science* 257:1398-1400.
- Peltier R, Schenk S (1993) Effects of serotonergic manipulations on cocaine self-administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 110:390-394.
- Peroutka SJ (1994) Molecular biology of serotonin (5-HT) receptors. *Synapse* 18:241-260.
- Perper JA, Van Thiel DH (1992) Respiratory complications of cocaine abuse. *Recent Dev Alcohol* 10:363-377.
- Pickel VM, Chan J (1990) Spiny neurons lacking choline acetyltransferase immunoreactivity are major targets of cholinergic and catecholaminergic terminals in rat striatum. *J Neurosci Res* 25:263-280.
- Pierce RC, Kalivas PW (1997) A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Res Brain Res Rev* 25:192-216.
- Pifl C, Giros B, Caron MG (1993) Dopamine transporter expression confers cytotoxicity to low doses of the parkinsonism-inducing neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridinium. *J Neurosci* 13:4246-4253.
- Pin JP, Duvoisin R (1995) The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* 34:1-26.
- Porcu M, Chiarugi A (2005) The emerging therapeutic potential of sirtuin-interacting drugs: from cell death to lifespan extension. *Trends Pharmacol Sci* 26:94-103.
- Potvin S, Stip E, Roy JY (2003) [Schizophrenia and addiction: An evaluation of the self-medication hypothesis]. *Encephale* 29:193-203.

- Pritchett DB, Bach AW, Wozny M, Taleb O, Dal Toso R, Shih JC, Seeburg PH (1988) Structure and functional expression of cloned rat serotonin 5HT-2 receptor. *Embo J* 7:4135-4140.
- Pulipparacharuvil S, Renthal W, Hale CF, Taniguchi M, Xiao G, Kumar A, Russo SJ, Sikder D, Dewey CM, Davis MM, Greengard P, Nairn AC, Nestler EJ, Cowan CW (2008) Cocaine regulates MEF2 to control synaptic and behavioral plasticity. *Neuron* 59:621-633.

-R-

- Rada-Iglesias A, Enroth S, Ameer A, Koch CM, Clelland GK, Respuela-Alonso P, Wilcox S, Dovey OM, Ellis PD, Langford CF, Dunham I, Komorowski J, Wadelius C (2007) Butyrate mediates decrease of histone acetylation centered on transcription start sites and down-regulation of associated genes. *Genome Res* 17:708-719.
- Ray-Gallet D, Quivy JP, Scamps C, Martini EM, Lipinski M, Almouzni G (2002) HIRA is critical for a nucleosome assembly pathway independent of DNA synthesis. *Mol Cell* 9:1091-1100.
- Redon C, Pilch D, Rogakou E, Sedelnikova O, Newrock K, Bonner W (2002) Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr Opin Genet Dev* 12:162-169.
- Reiner O, Carrozzo R, Shen Y, Wehnert M, Faustinella F, Dobyns WB, Caskey CT, Ledbetter DH (1993) Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein beta-subunit-like repeats. *Nature* 364:717-721.
- Reis AD, Castro LA, Faria R, Laranjeira R (2008) Craving decrease with topiramate in outpatient treatment for cocaine dependence: an open label trial. *Rev Bras Psiquiatr* 30:132-135.
- Renthal W, Maze I, Krishnan V, Covington HE, 3rd, Xiao G, Kumar A, Russo SJ, Graham A, Tsankova N, Kippin TE, Kerstetter KA, Neve RL, Haggarty SJ, McKinsey TA, Bassel-Duby R, Olson EN, Nestler EJ (2007) Histone deacetylase 5 epigenetically controls behavioral adaptations to chronic emotional stimuli. *Neuron* 56:517-529.
- Renthal W, Kumar A, Xiao G, Wilkinson M, Covington HE, 3rd, Maze I, Sikder D, Robison AJ, LaPlant Q, Dietz DM, Russo SJ, Vialou V, Chakravarty S, Kodadek TJ, Stack A, Kabbaj M, Nestler EJ (2009) Genome-wide analysis of chromatin regulation by cocaine reveals a role for sirtuins. *Neuron* 62:335-348.
- Ressler KJ, Nemeroff CB (1999) Role of norepinephrine in the pathophysiology and treatment of mood disorders. *Biol Psychiatry* 46:1219-1233.
- Richardson NR, Roberts DC (1996) Progressive ratio schedules in drug self-administration studies in rats: a method to evaluate reinforcing efficacy. *J Neurosci Methods* 66:1-11.
- Risner ME, Silcox DL (1981) Psychostimulant self-administration by beagle dogs in a progressive-ratio paradigm. *Psychopharmacology (Berl)* 75:25-30.
- Ritz MC, Cone EJ, Kuhar MJ (1990) Cocaine inhibition of ligand binding at dopamine, norepinephrine and serotonin transporters: a structure-activity study. *Life Sci* 46:635-645.
- Robbins TW, Everitt BJ (1996) Neurobehavioural mechanisms of reward and motivation. *Curr Opin Neurobiol* 6:228-236.
- Robbins TW, Everitt BJ (1999) Drug addiction: bad habits add up. *Nature* 398:567-570.
- Roberts DC, Andrews MM (1997) Baclofen suppression of cocaine self-administration: demonstration using a discrete trials procedure. *Psychopharmacology (Berl)* 131:271-277.
- Roberts DC, Corcoran ME, Fibiger HC (1977) On the role of ascending catecholaminergic systems in intravenous self-administration of cocaine. *Pharmacol Biochem Behav* 6:615-620.
- Robinson TE, Berridge KC (1993) The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Brain Res Rev* 18:247-291.
- Robinson TE, 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, Berridge KC (2003) Addiction. *Annu Rev Psychol* 54:25-53.
- Robinson TE, Gorny G, Mitton E, Kolb B (2001) Cocaine self-administration alters the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and neocortex. *Synapse* 39:257-266.
- Rocha BA, Fumagalli F, Gainetdinov RR, Jones SR, Ator R, Giros B, Miller GW, Caron MG (1998) Cocaine self-administration in dopamine-transporter knockout mice. *Nat Neurosci* 1:132-137.
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273:5858-5868.
- Rogakou EP, Nieves-Neira W, Boon C, Pommier Y, Bonner WM (2000) Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *J Biol Chem* 275:9390-9395.

- Rosin A, Lindholm S, Franck J, Georgieva J (1999) Downregulation of kappa opioid receptor mRNA levels by chronic ethanol and repetitive cocaine in rat ventral tegmentum and nucleus accumbens. *Neurosci Lett* 275:1-4.
- Roth SY, Denu JM, Allis CD (2001) Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* 70:81-120.
- Rousseaux S, Faure AK, Caron C, Lestrat C, Govin J, Hennebicq S, Sele B, Khochbin S (2004) [Organizing the sperm nucleus]. *Gynecol Obstet Fertil* 32:785-791.
- Rozen S, Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132:365-386.
- Ruffolo RR, Jr., Hieble JP (1994) Alpha-adrenoceptors. *Pharmacol Ther* 61:1-64.
- Ruiz-Carrillo A, Wangh LJ, Allfrey VG (1975) Processing of newly synthesized histone molecules. *Science* 190:117-128.

-S-

- Salamone JD, Correa M (2002) Motivational views of reinforcement: implications for understanding the behavioral functions of nucleus accumbens dopamine. *Behav Brain Res* 137:3-25.
- Salamone JD, Cousins MS, McCullough LD, Carriero DL, Berkowitz RJ (1994) Nucleus accumbens dopamine release increases during instrumental lever pressing for food but not free food consumption. *Pharmacol Biochem Behav* 49:25-31.
- Sanchis-Segura C, Spanagel R (2006) Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. *Addict Biol* 11:2-38.
- Sanchis-Segura C, Lopez-Atalaya JP, Barco A (2009) Selective boosting of transcriptional and behavioral responses to drugs of abuse by histone deacetylase inhibition. *Neuropsychopharmacology* 34:2642-2654.
- Santos-Rosa H, Caldas C (2005) Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. *Eur J Cancer* 41:2381-2402.
- Santos F, Hendrich B, Reik W, Dean W (2002) Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev Biol* 241:172-182.
- Sar M, Stumpf WE, Miller RJ, Chang KJ, Cuatrecasas P (1978) Immunohistochemical localization of enkephalin in rat brain and spinal cord. *J Comp Neurol* 182:17-37.
- Sarma K, Reinberg D (2005) Histone variants meet their match. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:139-149.
- Sato N, Fukushima N, Chang R, Matsubayashi H, Goggins M (2006) Differential and epigenetic gene expression profiling identifies frequent disruption of the RELN pathway in pancreatic cancers. *Gastroenterology* 130:548-565.
- Saunders LR, Verdin E (2007) Sirtuins: critical regulators at the crossroads between cancer and aging. *Oncogene* 26:5489-5504.
- Schenk S, Valadez A, Worley CM, McNamara C (1993) Blockade of the acquisition of cocaine self-administration by the NMDA antagonist MK-801 (dizocilpine). *Behav Pharmacol* 4:652-659.
- Schroeder FA, Lin CL, Crusio WE, Akbarian S (2007) Antidepressant-like effects of the histone deacetylase inhibitor, sodium butyrate, in the mouse. *Biol Psychiatry* 62:55-64.
- Schroeder JP, Packard MG (2002) Posttraining intra-basolateral amygdala scopolamine impairs food- and amphetamine-induced conditioned place preferences. *Behav Neurosci* 116:922-927.
- Schultz W (2000) Multiple reward signals in the brain. *Nat Rev Neurosci* 1:199-207.
- Schwer B, North BJ, Frye RA, Ott M, Verdin E (2002) The human silent information regulator (Sir)2 homologue hSIRT3 is a mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide-dependent deacetylase. *J Cell Biol* 158:647-657.
- Seamans JK, Yang CR (2004) The principal features and mechanisms of dopamine modulation in the prefrontal cortex. *Prog Neurobiol* 74:1-58.
- Shaham Y, Shalev U, Lu L, De Wit H, Stewart J (2003) The reinstatement model of drug relapse: history, methodology and major findings. *Psychopharmacology (Berl)* 168:3-20.
- Sharpe AL, Samson HH (2003) Ethanol and sucrose self-administration components: effects of drinking history. *Alcohol* 29:31-38.
- Shen HY, Kalda A, Yu L, Ferrara J, Zhu J, Chen JF (2008) Additive effects of histone deacetylase inhibitors and amphetamine on histone H4 acetylation, cAMP responsive element binding protein phosphorylation and DeltaFosB expression in the striatum and locomotor sensitization in mice. *Neuroscience* 157:644-655.
- Shiio Y, Eisenman RN (2003) Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:13225-13230.
- Siegfried Z, Eden S, Mendelsohn M, Feng X, Tsuberi BZ, Cedar H (1999) DNA methylation represses transcription in vivo. *Nat Genet* 22:203-206.

- 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.
- Sinagra M, Verrier D, Frankova D, Korwek KM, Blahos J, Weeber EJ, Manzoni OJ, Chavis P (2005) Reelin, very-low-density lipoprotein receptor, and apolipoprotein E receptor 2 control somatic NMDA receptor composition during hippocampal maturation in vitro. *J Neurosci* 25:6127-6136.
- Skoubis PD, Maidment NT (2003) Blockade of ventral pallidal opioid receptors induces a conditioned place aversion and attenuates acquisition of cocaine place preference in the rat. *Neuroscience* 119:241-249.
- Smith EM, Hoi JT, Eissenberg JC, Shoemaker JD, Neckameyer WS, Ilvarsonn AM, Harshman LG, Schlegel VL, Zempleni J (2007) Feeding *Drosophila* a biotin-deficient diet for multiple generations increases stress resistance and lifespan and alters gene expression and histone biotinylation patterns. *J Nutr* 137:2006-2012.
- Smith JA, Mo Q, Guo H, Kunko PM, Robinson SE (1995) Cocaine increases extraneuronal levels of aspartate and glutamate in the nucleus accumbens. *Brain Res* 683:264-269.
- 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.
- Sokoloff P, Giros B, Martres MP, Bouthenet ML, Schwartz JC (1990) Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. *Nature* 347:146-151.
- Solomon RL, Corbit JD (1974) An opponent-process theory of motivation. I. Temporal dynamics of affect. *Psychol Rev* 81:119-145.
- Sonders MS, Zhu SJ, Zahniser NR, Kavanaugh MP, Amara SG (1997) Multiple ionic conductances of the human dopamine transporter: the actions of dopamine and psychostimulants. *J Neurosci* 17:960-974.
- Sora I, Wichems C, Takahashi N, Li XF, Zeng Z, Revay R, Lesch KP, Murphy DL, Uhl GR (1998) Cocaine reward models: conditioned place preference can be established in dopamine- and in serotonin-transporter knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7699-7704.
- Sora I, Hall FS, Andrews AM, Itokawa M, Li XF, Wei HB, Wichems C, Lesch KP, Murphy DL, Uhl GR (2001) Molecular mechanisms of cocaine reward: combined dopamine and serotonin transporter knockouts eliminate cocaine place preference. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:5300-5305.
- Soria G, Mendizabal V, Tourino C, Robledo P, Ledent C, Parmentier M, Maldonado R, Valverde O (2005) Lack of CB1 cannabinoid receptor impairs cocaine self-administration. *Neuropsychopharmacology* 30:1670-1680.
- Spealman RD (1979) Behavior maintained by termination of a schedule of self-administered cocaine. *Science* 204:1231-1233.
- Spyraki C, Kazandjian A, Varonos D (1985) Diazepam-induced place preference conditioning: appetitive and antiaversive properties. *Psychopharmacology (Berl)* 87:225-232.
- Stefano GB, Goumon Y, Casares F, Cadet P, Fricchione GL, Rialas C, Peter D, Sonetti D, Guarna M, Welters ID, Bianchi E (2000) Endogenous morphine. *Trends Neurosci* 23:436-442.
- Sterner DE, Berger SL (2000) Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:435-459.
- Strahl BD, Allis CD (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* 403:41-45.
- Sucharov CC, Langer S, Bristow M, Leinwand L (2006) Shuttling of HDAC5 in H9C2 cells regulates YY1 function through CaMKIV/PKD and PP2A. *Am J Physiol Cell Physiol* 291:C1029-1037.
- Summers RJ, McMartin LR (1993) Adrenoceptors and their second messenger systems. *J Neurochem* 60:10-23.
- 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.
- Sunahara RK, Guan HC, O'Dowd BF, Seeman P, Laurier LG, Ng G, George SR, Torchia J, Van Tol HH, Niznik HB (1991) Cloning of the gene for a human dopamine D5 receptor with higher affinity for dopamine than D1. *Nature* 350:614-619.
- Suzuki MM, Bird A (2008) DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet* 9:465-476.

-T-

- Tang X, Gao JS, Guan YJ, McLane KE, Yuan ZL, Ramratnam B, Chin YE (2007) Acetylation-dependent signal transduction for type I interferon receptor. *Cell* 131:93-105.
- Taylor C (1884) Cocaine. *Lancet* 124:1068-1069.
- 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.
- Thomas DR, Hagan JJ (2004) 5-HT7 receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 3:81-90.

- 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* 29:1087-1092.
- Thomson S, Clayton AL, Hazzalin CA, Rose S, Barratt MJ, Mahadevan LC (1999) The nucleosomal response associated with immediate-early gene induction is mediated via alternative MAP kinase cascades: MSK1 as a potential histone H3/HMG-14 kinase. *Embo J* 18:4779-4793.
- Tirelli E, Terry P (1998) Amphetamine-induced conditioned activity and sensitization: the role of habituation to the test context and the involvement of Pavlovian processes. *Behav Pharmacol* 9:409-419.
- Tissir F, Goffinet AM (2003) Reelin and brain development. *Nat Rev Neurosci* 4:496-505.
- Trojer P, Reinberg D (2007) Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature? *Mol Cell* 28:1-13.
- Tsankova N, Renthal W, Kumar A, Nestler EJ (2007) Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* 8:355-367.
- Tsankova NM, Bertone O, Renthal W, Kumar A, Neve RL, Nestler EJ (2006) Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. *Nat Neurosci* 9:519-525.
- Tzschentke TM (2007) Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addict Biol* 12:227-462.

-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.
- United Nations Office on Drugs and Crime (2009) World Drug Report.
- Uz T, Ahmed R, Akhisaroglu M, Kurtuncu M, Imbesi M, Dirim Arslan A, Manev H (2005) Effect of fluoxetine and cocaine on the expression of clock genes in the mouse hippocampus and striatum. *Neuroscience* 134:1309-1316.

-V-

- van der Linden AM, Nolan KM, Sengupta P (2007) KIN-29 SIK regulates chemoreceptor gene expression via an MEF2 transcription factor and a class II HDAC. *Embo J* 26:358-370.
- Van Lint C, Emiliani S, Verdin E (1996) The expression of a small fraction of cellular genes is changed in response to histone hyperacetylation. *Gene Expr* 5:245-253.
- Van Tol HH, Bunzow JR, Guan HC, Sunahara RK, Seeman P, Niznik HB, Civelli O (1991) Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature* 350:610-614.
- Vaziri H, Dessain SK, Ng Eaton E, Imai SI, Frye RA, Pandita TK, Guarente L, Weinberg RA (2001) hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* 107:149-159.
- Vega RB, Harrison BC, Meadows E, Roberts CR, Papst PJ, Olson EN, McKinsey TA (2004) Protein kinases C and D mediate agonist-dependent cardiac hypertrophy through nuclear export of histone deacetylase 5. *Mol Cell Biol* 24:8374-8385.
- Verdel A, Curtet S, Brocard MP, Rousseaux S, Lemercier C, Yoshida M, Khochbin S (2000) Active maintenance of mHDA2/mHDAC6 histone-deacetylase in the cytoplasm. *Curr Biol* 10:747-749.
- Verdin E, Dequiedt F, Kasler HG (2003) Class II histone deacetylases: versatile regulators. *Trends Genet* 19:286-293.
- Villagra A, Cheng F, Wang HW, Suarez I, Glozak M, Maurin M, Nguyen D, Wright KL, Atadja PW, Bhalla K, Pinilla-Ibarz J, Seto E, Sotomayor EM (2009) The histone deacetylase HDAC11 regulates the expression of interleukin 10 and immune tolerance. *Nat Immunol* 10:92-100.
- Vincent S, Hokfelt T, Christensson I, Terenius L (1982) Immunohistochemical evidence for a dynorphin immunoreactive striato-nigral pathway. *Eur J Pharmacol* 85:251-252.
- Vinklerova J, Novakova J, Sulcova A (2002) Inhibition of methamphetamine self-administration in rats by cannabinoid receptor antagonist AM 251. *J Psychopharmacol* 16:139-143.
- Volkow ND, Hitzemann R, Wang GJ, Fowler JS, Wolf AP, Dewey SL, Handlesman L (1992) Long-term frontal brain metabolic changes in cocaine abusers. *Synapse* 11:184-190.
- Volkow ND, Wang GJ, Fischman MW, Foltin RW, Fowler JS, Abumrad NN, Vitkun S, Logan J, Gatley SJ, Pappas N, Hitzemann R, Shea CE (1997) Relationship between subjective effects of cocaine and dopamine transporter occupancy. *Nature* 386:827-830.
- Vorel SR, Ashby CR, Jr., Paul M, Liu X, Hayes R, Hagan JJ, Middlemiss DN, Stemp G, Gardner EL (2002) Dopamine D3 receptor antagonism inhibits cocaine-seeking and cocaine-enhanced brain reward in rats. *J Neurosci* 22:9595-9603.

Vyklicky L, Jr., Benveniste M, Mayer ML (1990) Modulation of N-methyl-D-aspartic acid receptor desensitization by glycine in mouse cultured hippocampal neurones. *J Physiol* 428:313-331.

-W-

- Walkinshaw DR, Tahmasebi S, Bertos NR, Yang XJ (2008) Histone deacetylases as transducers and targets of nuclear signaling. *J Cell Biochem* 104:1541-1552.
- Waltregny D, Glenisson W, Tran SL, North BJ, Verdin E, Colige A, Castronovo V (2005) Histone deacetylase HDAC8 associates with smooth muscle alpha-actin and is essential for smooth muscle cell contractility. *Faseb J* 19:966-968.
- Wang L, Lv Z, Hu Z, Sheng J, Hui B, Sun J, Ma L (2009) Chronic Cocaine-Induced H3 Acetylation and Transcriptional Activation of CaMKIIalpha in the Nucleus Accumbens Is Critical for Motivation for Drug Reinforcement. *Neuropsychopharmacology advance online publication* 9 December, as doi:10.1038/npp.2009.193.
- Wang Y, Wysocka J, Sayegh J, Lee YH, Perlin JR, Leonelli L, Sonbuchner LS, McDonald CH, Cook RG, Dou Y, Roeder RG, Clarke S, Stallcup MR, Allis CD, Coonrod SA (2004) Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylation. *Science* 306:279-283.
- 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.
- Weaver IC, Champagne FA, Brown SE, Dymov S, Sharma S, Meaney MJ, Szyf M (2005) Reversal of maternal programming of stress responses in adult offspring through methyl supplementation: altering epigenetic marking later in life. *J Neurosci* 25:11045-11054.
- Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, Dymov S, Szyf M, Meaney MJ (2004) Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci* 7:847-854.
- Weiner DM, Levey AI, Sunahara RK, Niznik HB, O'Dowd BF, Seeman P, Brann MR (1991) D1 and D2 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:1859-1863.
- Weinshenker D, Schroeder JP (2007) There and back again: a tale of norepinephrine and drug addiction. *Neuropsychopharmacology* 32:1433-1451.
- Welch RD, Todd K, Krause GS (1991) Incidence of cocaine-associated rhabdomyolysis. *Ann Emerg Med* 20:154-157.
- Wilkinson KD (2000) Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome. *Semin Cell Dev Biol* 11:141-148.
- Wirtshafter D, Sheppard AC (2001) Localization of GABA(B) receptors in midbrain monoamine containing neurons in the rat. *Brain Res Bull* 56:1-5.
- Wise RA (1987) Intravenous drug Self-Administration : a special case of positive reinforcement. In: *Methods of assessing the reinforcing properties of abused drugs* (RA Y, ed), pp 117-141. New York: Springer.
- Wise RA (1996) Neurobiology of addiction. *Curr Opin Neurobiol* 6:243-251.
- Wise RA, Bozarth MA (1985) Brain mechanisms of drug reward and euphoria. *Psychiatr Med* 3:445-460.
- Witkin JM, Goldberg SR (1990) Effects of cocaine on locomotor activity and schedule-controlled behaviors of inbred rat strains. *Pharmacol Biochem Behav* 37:339-342.
- Wojak JC, Flamm ES (1987) Intracranial hemorrhage and cocaine use. *Stroke* 18:712-715.
- Wolffe AP, Matzke MA (1999) Epigenetics: regulation through repression. *Science* 286:481-486.
- Wolffe AP, Hayes JJ (1999) Chromatin disruption and modification. *Nucleic Acids Res* 27:711-720.
- Woolley ML, Marsden CA, Fone KC (2004) 5-HT6 receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 3:59-79.
- Wu LP, Wang X, Li L, Zhao Y, Lu S, Yu Y, Zhou W, Liu X, Yang J, Zheng Z, Zhang H, Feng J, Yang Y, Wang H, Zhu WG (2008) Histone deacetylase inhibitor depsipeptide activates silenced genes through decreasing both CpG and H3K9 methylation on the promoter. *Mol Cell Biol* 28:3219-3235.

-X-

Xiong Y, Dowdy SC, Podratz KC, Jin F, Attewell JR, Eberhardt NL, Jiang SW (2005) Histone deacetylase inhibitors decrease DNA methyltransferase-3B messenger RNA stability and down-regulate de novo DNA methyltransferase activity in human endometrial cells. *Cancer Res* 65:2684-2689.

-Y-

Yamaguchi M, Suzuki T, Abe S, Baba A, Ito T, Okado N (2000) Time-course effects of a single administration of cocaine on receptor binding and subunit mRNAs of GABA(A) receptors. *Brain Res Mol Brain Res* 81:155-163.

- Yang XJ (2005) Multisite protein modification and intramolecular signaling. *Oncogene* 24:1653-1662.
- Yang XJ, Seto E (2008) The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:206-218.
- Yao WD, Gainetdinov RR, Arbuckle MI, Sotnikova TD, Cyr M, Beaulieu JM, Torres GE, Grant SG, Caron MG (2004) Identification on PSD-95 as a regulator of dopamine-mediated synaptic and behavioral plasticity. *Neuron* 41:625-638.
- Yokel RA, Wise RA (1978) Amphetamine-type reinforcement by dopaminergic agonists in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 58:289-296.
- Yoshida M, Kijima M, Akita M, Beppu T (1990) Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J Biol Chem* 265:17174-17179.
- Yoshida M, Furumai R, Nishiyama M, Komatsu Y, Nishino N, Horinouchi S (2001) Histone deacetylase as a new target for cancer chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 48 Suppl 1:S20-26.
- You JS, Kang JK, Lee EK, Lee JC, Lee SH, Jeon YJ, Koh DH, Ahn SH, Seo DW, Lee HY, Cho EJ, Han JW (2008) Histone deacetylase inhibitor apicidin downregulates DNA methyltransferase 1 expression and induces repressive histone modifications via recruitment of corepressor complex to promoter region in human cervix cancer cells. *Oncogene* 27:1376-1386.
- Yuferov V, Nielsen D, Butelman E, Kreek MJ (2005) Microarray studies of psychostimulant-induced changes in gene expression. *Addict Biol* 10:101-118.

-Z-

- Zalensky AO, Siino JS, Gineitis AA, Zalenskaya IA, Tomilin NV, Yau P, Bradbury EM (2002) Human testis/sperm-specific histone H2B (hTSH2B). Molecular cloning and characterization. *J Biol Chem* 277:43474-43480.
- Zhang D, Pan ZH, Zhang X, Brideau AD, Lipton SA (1995) Cloning of a gamma-aminobutyric acid type C receptor subunit in rat retina with a methionine residue critical for picrotoxinin channel block. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:11756-11760.
- Zhang X, Yuan Z, Zhang Y, Yong S, Salas-Burgos A, Koomen J, Olashaw N, Parsons JT, Yang XJ, Dent SR, Yao TP, Lane WS, Seto E (2007) HDAC6 modulates cell motility by altering the acetylation level of cortactin. *Mol Cell* 27:197-213.
- Zhang XY, Kosten TA (2007) Previous exposure to cocaine enhances cocaine self-administration in an alpha 1-adrenergic receptor dependent manner. *Neuropsychopharmacology* 32:638-645.
- Zhang Y (2003) Transcriptional regulation by histone ubiquitination and deubiquitination. *Genes Dev* 17:2733-2740.
- Zhang Y, Reinberg D (2001) Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev* 15:2343-2360.
- Zhang Y, Li N, Caron C, Matthias G, Hess D, Khochbin S, Matthias P (2003) HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo. *Embo J* 22:1168-1179.
- Zhu SJ, Kavanaugh MP, Sonders MS, Amara SG, Zahniser NR (1997) Activation of protein kinase C inhibits uptake, currents and binding associated with the human dopamine transporter expressed in *Xenopus* oocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 282:1358-1365.

The inhibition of histone deacetylases regulates cocaine self-administration in rats

Abstract:

Cocaine is an addictive stimulant drug abused by humans and self-administered by rats. Drug addiction is a chronic brain disease characterized primarily by a compulsive drug-seeking and drug-taking behavior. A unique characteristic of drug addiction, from a clinical point of view, is the persistence of relapse risk long after a person has stopped taking drugs, which constitutes a major obstacle to successful treatment. Cocaine blocks the monoamine transporters, resulting in increased synaptic levels of the amines. The dopaminergic system in particular is thought to represent a key pathway by which psychostimulants produce reinforcement. On the other hand, cocaine administration has been shown to elicit induction in neurons of several immediate early genes that encode transcription factors. Recent data have shown that gene transcription is controlled by epigenetic mechanisms that include DNA methylation and modifications of histones such as acetylation. We show here that injection of several histone deacetylase inhibitors, like trichostatin A (TsA), to rats was sufficient to reduce the reinforcing properties of cocaine and decrease the motivation of the animals to self-administer cocaine but not sucrose. The data also report the blockade of behavioral sensitization by TsA, as well as the reduction of cocaine-seeking behavior induced after a withdrawal period. The effect of TsA on cocaine self-administration was associated with an alteration of the expression of *Mecp2* (methyl CpG binding protein 2), of the histone deacetylase *HDAC11* and of the transcription factor *MEF2C*. Modification of the self-administration behavior in response to TsA was accompanied by extensive changes in gene expression in the cingulate cortex and in the nucleus accumbens, as assessed by cDNA microarray technology. Among the genes induced by cocaine self-administration, we found *Lisencephaly gene-1* and *Reelin*, gene that belong to the same transduction pathway. Mutations within both genes are causing lissencephaly. TsA caused their expression to increase in the cortex and to decrease in the nucleus accumbens. Our results suggest that mechanisms important for the formation of cortical layers during development are used again during adulthood to establish brain plasticity in response to cocaine. The mechanisms, which are under the control of epigenetic factors, especially histone deacetylases, may participate in the development of drug dependence.

L'inhibition des histones désacétylases régule le comportement d'auto-administration de cocaïne chez le rat

Résumé :

La consommation de substances illicites, telles que la cocaïne, constitue un problème important de santé publique. Les puissants effets renforçants de la cocaïne conduisent certains individus à une consommation abusive voire à une dépendance. Au sein du circuit de récompense, la cocaïne bloque la recapture présynaptique des monoamines, ce qui est à l'origine d'une plasticité neuronale impliquant la transcription de nombreux gènes. Des études récentes ont montré que la transcription de ces gènes était sous le contrôle de mécanismes épigénétiques, concernant essentiellement la méthylation de l'ADN et les modifications posttraductionnelles des histones dont l'acétylation.

Au cours de cette étude, nous avons montré d'abord que l'inhibition des histones désacétylases par divers composés pharmacologiques dont la trichostatine A (TsA) diminuait les propriétés renforçantes de la cocaïne et la motivation des rats à en consommer, sans affecter les effets récompensants du saccharose. La TsA bloque aussi la sensibilisation comportementale induite par la cocaïne et diminue le comportement de recherche de cocaïne après une période de sevrage. Les effets de la TsA sur l'auto-administration de cocaïne sont accompagnés par la modification de l'expression du facteur de liaison à l'ADN méthylé *Mecp2*, de l'histone désacétylase *HDAC11* et du facteur de transcription *MEF2C*. Nous avons procédé à l'analyse du transcriptome chez des rats, au niveau du cortex cingulaire antérieur et du noyau accumbens, afin de caractériser un ensemble de gènes sous-jacents aux modifications comportementales. Parmi ceux-ci figurent les gènes *Lissencephaly gene-1* et *Reeline*, deux gènes qui, lorsqu'ils sont mutés chez l'homme, sont à l'origine d'une lissencéphalie caractérisée par la désorganisation des couches corticales résultant d'un défaut de migration neuronale. L'auto-administration de cocaïne induit l'expression des deux gènes. La TsA potentialise l'induction dans le cortex, mais la bloque dans le noyau accumbens. Il apparaît que l'administration répétée de cocaïne réenclenche des mécanismes déjà utilisés lors du développement du cortex cérébral, afin de mettre en place une plasticité synaptique. Cette plasticité est susceptible de participer au développement de la dépendance aux drogues. Notons que l'ensemble de ces mécanismes est sous le contrôle étroit de facteurs épigénétiques, notamment des histones désacétylases.