

# Bases moléculaires de l'addiction

---

L'addiction est une maladie chronique, sous-tendue par des modifications persistantes des réseaux neuronaux impliqués dans les processus de récompense. La mise en place de cet état pathologique repose sur la capacité des drogues à détourner les circuits de récompense en agissant sur la modulation dopaminergique, essentielle à leur fonctionnement.

L'addiction apparaît comme une forme pathologique d'apprentissage qui repose sur des mécanismes de plasticité neuronale très largement partagés avec les processus normaux d'apprentissage et de mémoire. En modifiant la concentration extracellulaire en DA, les drogues impactent la signalisation intracellulaire en aval de ce neuromodulateur et les mécanismes de plasticité neuronale qui en dépendent. Les adaptations cellulaires et moléculaires induites par les drogues au sein des neurones du système de récompense jouent un rôle central dans la mise en place des altérations comportementales à long terme observées dans l'addiction ([Robison and Nestler, 2011](#)).

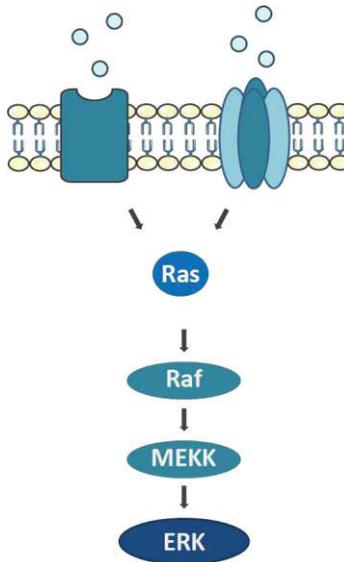
La plasticité neuronale reflète la capacité des neurones à modifier durablement leur fonctionnement en réponse à des signaux électriques ou chimiques spécifiques. Ces adaptations à long terme dépendent de modifications de la composition moléculaire des neurones au travers de régulations géniques importantes pour la synthèse de nouvelles protéines ([Kandel, 2001](#)). Les voies de signalisation intracellulaires jouent un rôle important dans la plasticité neuronale en permettant un couplage efficace entre l'activité synaptique induite par les signaux extracellulaires et l'initiation d'évènements intracellulaires qui sous-tendent les changements durables du fonctionnement neuronal. Bien qu'ayant des modes d'action différents, les drogues d'abus, induisent des adaptations moléculaires très similaires en agissant sur des voies de signalisation communes ([Nestler, 2005](#)). Ce chapitre abordera plus particulièrement l'implication des protéines de la voie des ERK, activée par les drogues dans les circuits de récompense. Dans le striatum, la voie ERK activée en aval des D1R (Récepteur dopaminergiques de type D1) et NMDAR est un substrat moléculaire important pour l'intégration de signaux dopaminergiques et glutamatergiques au sein des MSN ([Girault et al., 2007](#)). L'activation de cette voie joue un rôle majeur dans le développement des adaptations neuronales et comportementales induites par les drogues ([Lu et al., 2006](#)).

## 1. La voie ERK

La voie ERK appartient au groupe des voies de signalisation de type MAPK (Mitogen Activated Protéine Kinase). Ces voies de transduction intracellulaires sont impliquées dans la propagation de signaux de la membrane vers le noyau et participent aux mécanismes de régulations géniques dépendants de l'activité neuronale. Trois grandes familles de MAPK ont été décrites à ce jour : la famille des MAPK/ERK, la famille des MAPK/JNK (c-Jun N-terminal Kinase) et la famille des MAPK/p38 (Derkinderen et al., 1999, Raman et al., 2007).

Dans les cellules non-neuronales, les MAPK sont impliquées dans les processus de prolifération, de différenciation et de survie (Volmat and Pouyssegur, 2001). Dans les neurones post-mitotiques du SNC, les protéines ERK sont abondamment exprimées (Fiore et al., 1993, Hollister et al., 1997). Dans cette partie, seules les données concernant la voie ERK au sein des neurones seront abordées. S'il existe huit isoformes de ERK (ERK1-8), ERK1 et ERK2 restent les mieux décrites dans le SNC. ERK1/2 sont exprimées de manière ubiquitaire dans le cerveau, avec un niveau d'expression variable des deux isoformes selon les régions cérébrales (Ortiz et al., 1995). Dans les neurones, les ERK1/2 sont localisées et activées dans les dendrites, le soma, le noyau et les terminaisons axonales (Hyman et al., 1994, Ortiz et al., 1995). ERK est activée par de nombreux stimuli extracellulaires agissant sur des récepteurs de type ionotrophique ou métabotrophique. La voie ERK intervient dans un très grand nombre de fonctions cellulaires telles que la survie neuronale mais aussi dans la mise en place d'adaptations cellulaires durables importantes pour la plasticité neuronale (Sweatt, 2004, Thomas and Huganir, 2004)

Les MAPK de type ERK sont phosphorylées en réponse à des signaux extracellulaires spécifiques, par l'activation séquentielle de différentes protéines kinases, dont principalement la cascade Ras-Raf-MEK, immédiatement en amont des ERK. L'initiation de cette cascade de signalisation débute à la membrane par l'activation d'une petite protéine G qui active la première kinase en amont, à savoir la MAPK/ERK-kinase-kinases (MEKK) Raf, principalement B-Raf ou Raf-1 dans le cerveau. Les MEKK phosphorylent et activent les MAPK/ERK-kinases (MEK) qui activent à leur tour les MAPK par phosphorylation (**Figure 6**).



**Figure 6 : Représentation simplifiée des étapes principales de la cascade de signalisation ERK**

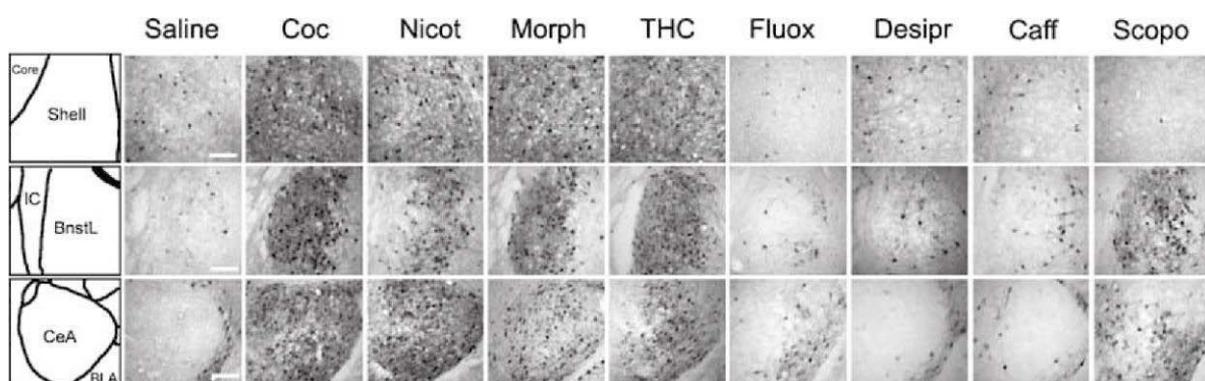
La voie ERK est activée en réponse à de nombreux stimuli extracellulaires agissant sur des récepteurs ionotropiques ou métabotropiques. Les MAPK de type ERK sont phosphorylées en réponse à des signaux extracellulaires spécifiques, par l'activation séquentielle de différentes protéines kinases, dont principalement la cascade Ras-Raf-MEK, immédiatement en amont des ERK. (voir texte pour plus de détails)

## 2. La voie ERK, une cible commune des drogues d'abus

L'activation de ERK par les drogues a initialement été décrite dans l'ATV chez le rat, suite à l'injection chronique de cocaïne ou de morphine (Berhow et al., 1995). Cette activation résulte d'un processus homéostatique impliquant le facteur neurotrophique BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor). La première démonstration de l'activation de ERK dans le striatum a été apportée par des travaux du groupe du Dr. Caboche qui ont montré que l'administration aiguë de cocaïne augmente le niveau de phosphorylation de ERK dans le striatum ventral et dorsal (Valjent et al., 2000). Cet événement survient de manière rapide et transitoire dans les neurones striataux et se maintient au cours d'un traitement chronique. L'activation de la voie ERK s'est ensuite révélée comme un mécanisme cellulaire commun à de nombreuses drogues telles que le cannabis, la d-amphétamine, la méthamphétamine, la morphine, la nicotine ou encore l'alcool (Valjent et al., 2001, Choe et al., 2002, Salzman et al., 2003, Valjent et al., 2004, Ibba et al., 2009).

L'analyse de différentes régions cérébrales a révélé l'existence d'un patron régional d'activation de ERK commun à de nombreuses drogues (Valjent et al., 2004) (Figure 7).

L'augmentation du niveau de phosphorylation de ERK dans le NAcc, la partie latérale du BNST (**B**ed **N**ucleus of **S**triatum **T**erminalis), l'amygdale et le cortex préfrontal s'est avérée être une caractéristique commune à de nombreuses substances addictives (Valjent et al., 2004, Zhai et al., 2008). Ce patron d'activation n'est d'ailleurs pas retrouvé pour des substances stimulantes peu addictives telle que la caféine (Valjent et al., 2004). Dans la majorité de ces régions, l'activation de ERK dépend de la stimulation des D1R (Valjent et al., 2004). Cependant, dans certaines régions cérébrales, tel que le cortex préfrontal, l'activation de ERK s'est avérée indépendante des D1R et met en jeu les récepteurs  $\beta$ 1-adrénérgiques (Pascoli et al., 2005). Dans le striatum, l'activation de ERK en réponse à une injection unique de cocaïne ou d'amphétamine est restreinte aux MSN exprimant les D1R (Bertran-Gonzalez et al., 2008, Gerfen et al., 2008). A l'inverse, l'administration de l'halopéridol, un antagoniste des D2R (Récepteur dopaminergiques de type D2) conduit à une activation de ERK spécifiquement dans les MSN exprimant ce récepteur (Bertran-Gonzalez et al., 2008). La régulation opposée de l'activité de ERK entre les D1-MSN et les D2-MSN, en réponse à la cocaïne, a récemment été mise en évidence, *in vivo*, au travers d'une étude basée sur la détection par FRET (**F**örster **R**esonance **E**nergy **T**ransfer) de l'activité de ERK par micro-endoscopie chez l'animal vigile (Goto et al., 2015). Cette étude démontre que la dynamique de l'activation ERK, *in vivo*, est contrôlée de manière opposée par des stimuli récompensant ou aversifs puisque l'administration de cocaïne active ERK dans les D1-MSN et l'inhibe dans les D2-MSN alors que des chocs électriques déclenchent un profil d'activation de ERK en miroir (Goto et al., 2015).



**Figure 7 : Activation sélective de ERK dans l'amygdale étendue en réponse aux substances stimulantes addictives ou non addictives.**

La forme phosphorylée de ERK1/2 est détectée dans la coquille (shell) du NAcc (panneau du haut), la BNST (Bed nucleus of striata terminalis) (panneau du milieu) et le noyau de l'amygdale centrale (CeA) (panneau du bas) après l'administration de cocaïne, nicotine, morphine,  $\Delta$ -9 tetra hydro-cannabinol, fluoxétine, désipramine, caféine et scopolamine. (Barre d'échelle, 60  $\mu$ m) (Valjent et al., 2004).

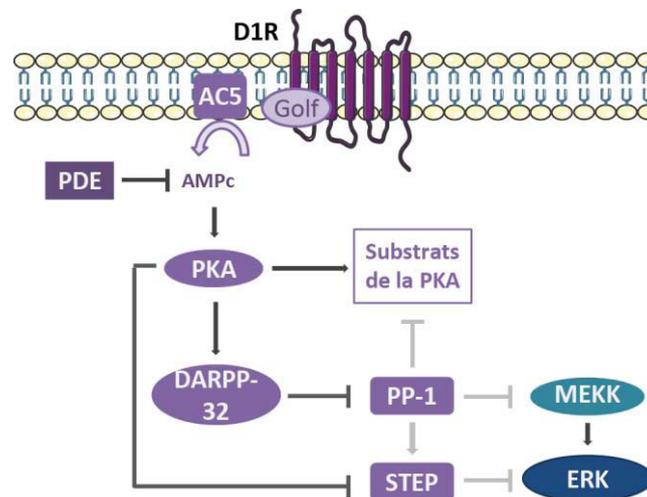
### 3. Activation de ERK par les drogues, convergence des signaux DA et glutamate au sein des MSN

L'intégration des afférences dopaminergiques et glutamatergiques au sein du striatum apparaît comme un mécanisme clé pour la mise en place des adaptations neuronales durables qui sous-tendent l'addiction. Cette convergence est retrouvée dans les neurones striataux au sein desquels l'interaction moléculaire entre ces deux systèmes joue un rôle clé dans les altérations induites par les drogues. Les modalités d'activation de la voie ERK apparaissent comme le reflet de ces interactions positionnant ERK à un point de convergence moléculaire en aval de la stimulation des D1R et NMDAR. En effet, dans les neurones striataux, l'activation de ERK dépend de la stimulation concomitante de ces deux types de récepteurs (Valjent et al., 2000, Jenab et al., 2005, Sun et al., 2007).

#### a. Mécanismes d'activation de ERK en aval des D1R

Les D1R sont des récepteurs métabotropiques qui sont positivement couplés à l'adénylyl cyclase V via la protéine Gas/olf dans le striatum (Herve et al., 2001). La stimulation de ces récepteurs par la dopamine est associée à une augmentation de la concentration intracellulaire en AMPc (Adénosine Mono Phosphate Cyclique) qui conduit à l'activation de la protéine kinase A (PKA). La fenêtre d'activation de la PKA est contrôlée par des boucles de régulation impliquant l'activation de phosphodiésterases (PDE) exprimées dans le striatum et capables de limiter la production d'AMPc (Menniti et al., 2006). La PKA est une sérine-thréonine kinase qui possède un grand nombre de substrats au travers desquels elle régule de nombreux processus cellulaires tels que la conductance membranaire ou l'expression de gènes. Parmi les cibles de la PKA, on trouve notamment la sous-unité GluN1 des NMDAR (Snyder et al., 1998) ou encore le facteur de transcription CREB (cAMP-responsive element binding protein) dont nous verrons plus tard qu'il joue un rôle clé dans la régulation de gènes importants pour la plasticité striatale. La PKA ne phosphoryle pas directement ERK mais elle est impliquée dans le contrôle de son activation en aval des D1R par l'intermédiaire d'autres protéines cibles. Parmi ces protéines, la phosphatase STEP (Striatal Enriched Protein Phosphatase), dont la phosphorylation par la PKA diminue la liaison à ses substrats, dont ERK (Pulido et al., 1998, Paul et al., 2000).

Par ce mécanisme, l'activation de la PKA conduit indirectement à une augmentation du niveau de phosphorylation de ERK. Une autre protéine, DARPP-32 (**D**opamine and **c**AMP-**r**egulated **p**hosphop**r**otein) contribue également à amplifier l'activation de ERK en aval de la stimulation des D1R (Valjent et al., 2005). Le résidu Thréonine 34 de DARPP-32 est une cible directe de la PKA, qui, lorsqu'elle est phosphorylée par cette dernière, devient un puissant inhibiteur de la phosphatase PP-1 (**P**rotéine **P**hosphatase **1**) (Greengard et al., 1999). L'inhibition de PP-1 diminue la déphosphorylation de STEP et par conséquent la liaison à ses substrats, favorisant ainsi l'augmentation du niveau de phosphorylation de ERK. Ces deux boucles de signalisation situées en aval de la voie D1/AMPC/PKA convergent vers l'augmentation du niveau de phosphorylation de ERK en aval de la stimulation des D1R (Figure 8).



**Figure 8 : Schéma de l'activation de ERK en aval de la voie D1/AMPC/PKA/DARPP-32**

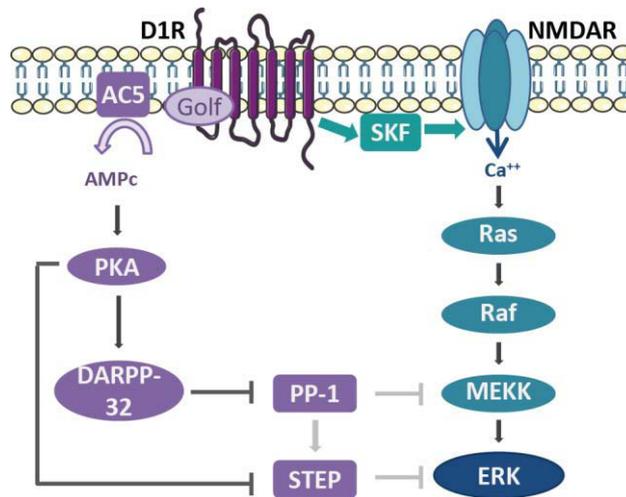
Les différents acteurs de la voie D1/AMPC/PKA/DARPP-32 sont schématisés dans cette figure. En aval de la stimulation du D1R, la production d'AMPC et l'activation de la PKA conduisent à une inhibition des phosphatases PP-1 et STEP qui convergent vers une facilitation de l'activation de ERK.

Dans les neurones, de nombreux mécanismes cellulaires sont impliqués dans l'activation de ERK au travers de l'augmentation des influx calciques (Finkbeiner and Greenberg, 1996). L'activation des NMDAR induite par la fixation du glutamate, entraîne une entrée massive de calcium dans les MSN. Cet influx de calcium conduit à l'activation de la petite protéine G, Ras, par l'intermédiaire de Ras-GRF, un facteur d'échange de nucléotide guanine (GDP en GTP). Ce facteur d'échange est exprimé spécifiquement dans le SNC où il est activé par le complexe  $Ca^{2+}$ /Calmoduline (Farnsworth et al., 1995). Une fois activée, la petite protéine G

Ras active à son tour la protéine Raf et déclenche ainsi la cascade d'activation de la voie des MAPK qui se poursuit par l'activation par Raf et finalement ERK (Fasano et al., 2009).

#### **b. ERK, détecteur de coïncidence**

Dans les neurones striataux, la stimulation des D1R joue un rôle majeur dans l'activation de ERK par les drogues. En effet, ERK est très majoritairement activé dans les MSN exprimant les D1R et le traitement par un antagoniste D1R abolit cette activation (Valjent et al., 2001, Valjent et al., 2005, Bertran-Gonzalez et al., 2008). La stimulation des NMDAR est également requise pour l'activation de ERK par les drogues (Valjent et al., 2000), positionnant ERK à un point de convergence entre les signaux dopaminergiques et glutamatergiques (**Figure 9**). A la lumière de ces observations, il a été proposé que l'activation de ERK agirait comme un détecteur de coïncidence de l'activation des afférences glutamatergiques et dopaminergiques (Girault et al., 2007). Par ce mécanisme, l'activation de ERK intègre les informations contextuelles portées par les signaux glutamatergiques en provenance du cortex et du thalamus et le signal de la prédiction d'erreur porté par la libération de DA. Si l'injection aiguë de cocaïne augmente significativement la concentration extracellulaire de DA, elle ne modifie pas les niveaux de glutamate ambiant (Zhang et al., 2001). Une étude a récemment montré que la stimulation des D1R potentialise les entrées de calcium au travers des NMDAR par le biais de la phosphorylation de la sous-unité GluN2B de ces récepteurs glutamatergiques. Ce mécanisme fait intervenir une protéine de la famille des SFK (**S**rc **F**amily **K**inase) activée en réponse à la cocaïne (Pascoli et al., 2011). Cette voie de signalisation, indépendante de la production d'AMPC est nécessaire pour déclencher l'activation de ERK en réponse à la cocaïne (**Figure 9**). Plus récemment, notre laboratoire a montré que la liaison physique directe (i.e. oligomérisation) entre le D1R et la sous-unité GluN1 des NMDAR était nécessaire à la potentialisation des flux calciques via les GluN2B-NMDAR par la dopamine ainsi qu'à l'activation de ERK par la cocaïne (Cahill et al., 2014a).



**Figure 9 : L'activation de ERK par la cocaïne dans le striatum est un intégrateur des signaux dopaminergiques et glutamatergiques**

Représentation schématique des voies de signalisation en aval des D1R et NMDAR convergeant sur la voie ERK en réponse à une injection unique de cocaïne.

**4. ERK et les adaptations comportementales induites par les drogues**

Au cours des dernières années, de nombreuses études ont contribué à démontrer le rôle de ERK dans les adaptations comportementales induites par les drogues d'abus (Lu et al., 2006, Girault et al., 2007, Pascoli et al., 2014). Ces observations ont été faites en grande partie à l'aide de composés pharmacologiques permettant de bloquer l'activité de la kinase MEK. Parmi ces composés, le SL327, un agent pharmacologique capable de passer la barrière hémato-encéphalique permet l'inhibition de ERK par voie systémique. Si cette approche ne permet pas de contrôler la région dans laquelle ERK est inhibée, elle présente cependant l'intérêt d'être très peu invasive.

**a. ERK et sensibilisation locomotrice**

L'injection de ce composé à des doses suffisantes pour inhiber la phosphorylation de ERK n'altère ni l'activité locomotrice basale des animaux ni leur réponse aiguë (hyperactivité locomotrice) à une première injection de cocaïne ou d'amphétamine (Valjent et al., 2006b). Ces données suggèrent que la voie ERK est peu ou pas impliquée dans la réponse aiguë aux psychostimulants. A l'inverse, l'activation rapide et transitoire de cette voie dès la première injection de drogue semble jouer un rôle clé dans la mise en place d'adaptations

comportementales à long terme. En effet, l'induction de la sensibilisation locomotrice à la cocaïne ou l'amphétamine est abolie par l'administration du SL327 avant la première injection de drogue (Ferguson et al., 2006, Valjent et al., 2006a). En revanche, l'activation de ERK n'est pas requise pour l'expression de la sensibilisation chez des animaux précédemment sensibilisés et soumis à une injection de cocaïne après une période de sevrage (Valjent et al., 2006a). Ces adaptations comportementales semblent dépendantes de l'activation de l'isoforme ERK-2 puisque l'inactivation génétique de ERK-1 entraîne un effet inverse, à savoir une potentialisation de la sensibilisation locomotrice (Ferguson et al., 2006). De manière intéressante, l'inhibition de ERK dans l'ATV par infusion du PD98059, conduit à une diminution de la sensibilisation locomotrice (Pierce et al., 1999) alors que l'administration aiguë de cocaïne n'entraîne pas d'augmentation de l'activation de ERK dans cette région (Valjent et al., 2004). L'exposition à un stress chronique conduit à une augmentation de la phosphorylation de ERK dans l'ATV qui est associée à un accroissement de la sensibilisation locomotrice à la cocaïne (Yap et al., 2015). L'inhibition de l'activité de ERK localement dans l'ATV, par injection de U0126, avant l'exposition au stress, tend à prévenir cette augmentation de la sensibilisation comportementale induite par la cocaïne (Yap et al., 2015).

#### **b. ERK et préférence de place conditionnée (CPP)**

L'induction d'un conditionnement de type CPP, classiquement présentée comme un index de l'effet récompensant des drogues est également dépendant de l'activation de ERK. Au cours de la phase de conditionnement, l'animal reçoit la drogue dans un environnement et le véhicule dans un autre environnement. Lors de la session test, l'animal est libre d'explorer les deux environnements et l'augmentation du temps passé dans le compartiment associé à la drogue reflète la mise en place d'une préférence de place conditionnée. Le blocage de ERK par l'injection systémique de SL327 avant ou après chaque session de conditionnement empêche le développement de la CPP induite par la cocaïne (Valjent et al., 2000), le THC (Valjent et al., 2001) ou la métamphétamine (Salzmann et al., 2003). L'injection locale dans le NAcc d'un autre inhibiteur de MEK, le PD98059, avant ou immédiatement après les sessions de conditionnement, prévient également le développement de la CPP (Gerdjikov et al., 2004). Ces données indiquent que l'activation de ERK est importante pour l'association entre les effets récompensant des drogues et les indices environnementaux qui leur sont

associés. De la même manière que pour la sensibilisation locomotrice, les souris ERK-1 knock-out présentent une préférence de place augmentée pour la cocaïne (Ferguson et al., 2006) et la morphine (Mazzucchelli et al., 2002).

### **c. ERK, rappel et reconsolidation de la mémoire associée à la drogue**

L'activation de ERK semble également impliquée dans le rappel d'une mémoire précédemment associée à la drogue. En effet, l'exposition à un contexte associé à la cocaïne pendant la CPP augmente la phosphorylation de ERK dans le NAcc et une injection locale d'un inhibiteur de MEK, le U0126, immédiatement avant le test bloque l'activation de ERK ainsi que l'expression de la CPP induite par la cocaïne (Miller and Marshall, 2005). ERK semble également impliquée dans la reconsolidation d'une mémoire associée à la drogue puisque l'administration par voie systémique du SL327 bloque l'expression de la CPP lorsqu'il est administré avant l'injection de cocaïne lors d'une session supplémentaire de conditionnement (Valjent et al., 2006a).

### **d. ERK, symptômes de manque et rechute**

La reprise de la consommation de drogue au cours des épisodes de rechute qui suivent une période d'abstinence, est souvent précipitée par l'exposition au contexte (O'Brien, 2005). Dans la période qui suit l'arrêt de la consommation, les individus sont sensibilisés aux indices environnementaux associés à la drogue et la rencontre avec ces stimuli déclenche le désir irrésistible de consommer la substance. Les données issues des modèles animaux indiquent que la sensation de manque ne s'atténue pas au cours de la période de sevrage mais tend plutôt à s'accroître, ce qui a conduit à définir ce phénomène comme une « incubation » du désir de consommer la substance (Grimm et al., 2001, Lu et al., 2004). Après une longue période de sevrage de 30 jours suivant un protocole d'auto-administration, la réexposition au contexte associé à la drogue augmente la phosphorylation de ERK dans l'amygdale (Lu et al., 2005). L'injection locale dans l'amygdale, du U0126, un inhibiteur de MEK, prévient la reprise du comportement d'auto-administration chez le rat (Lu et al., 2005) montrant ainsi l'implication de ERK dans cette réponse conditionnée. La phosphorylation de ERK est également augmentée dans le cortex préfrontal médian suite à la réexposition à des indices précédemment associés à la cocaïne, suggérant que cette structure pourrait jouer un rôle

important dans l'incubation manqué lié à la cocaïne (Koya et al., 2009). L'incubation du désir de consommer une substance est corrélée avec une augmentation des taux de BDNF dans l'ATV, le NAcc et l'amygdale (Grimm et al., 2003, Pu et al., 2006), qui pourrait être associée à l'activité de ERK (Lu et al., 2004, Lu et al., 2005).

## 5. ERK et la plasticité synaptique induite par les drogues

Les adaptations comportementales à long terme observées en réponse aux drogues reflètent leur impact durable sur le fonctionnement des circuits de récompense au-delà de la cinétique d'augmentation de la DA. L'exposition aux drogues modifie la transmission synaptique au sein de ces régions cérébrales conduisant à la mise en place d'une plasticité synaptique qui contribue à la réorganisation des réseaux neuronaux. Cette plasticité synaptique induite par les drogues semble jouer un rôle important dans les altérations comportementales observées dans l'addiction (Luscher and Malenka, 2011).

Dans le striatum, la voie ERK activée par les drogues joue un rôle central dans les modifications durables de l'activité synaptique des MSN (Pascoli et al., 2014). L'activation de ERK est requise pour la mise en place de la LTP dans les MSN dans un modèle *ex vivo* de tranches striatales (Pascoli et al., 2012). Chez les souris ERK1 KO, l'augmentation de la sensibilisation locomotrice est associée à une augmentation de la LTP induite par des stimulations à haute fréquence dans le NAcc (Ferguson et al., 2006). L'hyperactivation de ERK2 dans ce modèle de perte d'expression de ERK1 suggère que l'augmentation d'activité de ERK2 accentue la sensibilité aux drogues. Dans le NAcc, l'exposition à la cocaïne conduit à une occlusion de la LTP induite par des stimulations à haute fréquence, spécifiquement dans les D1-MSN (Pascoli et al., 2012). L'inhibition de l'activité de ERK dans le NAcc qui est associée à une diminution de la sensibilisation locomotrice conduit également à une perte de cette occlusion de la LTP par la cocaïne (Pascoli et al., 2012). Cette étude montre également que l'activation de ERK au cours des minutes suivant une première injection de cocaïne est requise pour le renforcement de l'efficacité synaptique détectée 5 jours après l'injection. De manière intéressante, l'application d'un protocole de type LFS (**L**ow **F**requency **S**timulation) par stimulation optogénétique du NAcc chez des animaux exposés à la cocaïne, conduit à une restauration de la transmission synaptique des MSN et entraîne une perte de la sensibilisation locomotrice induite par cette drogue. Cette étude permet d'établir un lien causal entre

l'activation de la voie ERK, la potentialisation des synapses glutamatergiques et les réponses comportementales induites par la cocaïne (Pascoli et al., 2012).

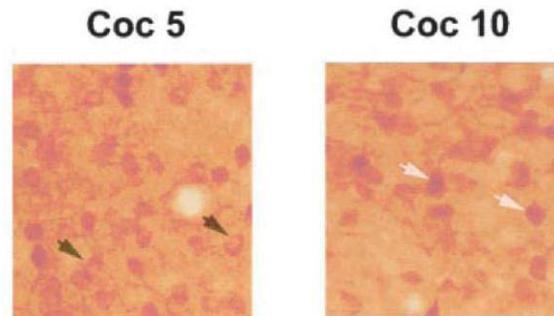
La régulation du trafic des récepteurs AMPA est un mécanisme cellulaire central dans la mise en place de la plasticité synaptique. L'activation de ERK conduit à une augmentation rapide de l'expression des récepteurs AMPA de surface qui est requise pour l'expression de la LTP (Zhu et al., 2002). De la même manière, l'inhibition de ERK bloque l'insertion des récepteurs AMPA au cours de la mise en place de la LTP dans l'hippocampe (Patterson et al., 2010). Dans le NAcc, l'augmentation de l'activité de ERK est corrélée avec l'expression des AMPA de surface au cours d'un sevrage suite à une exposition chronique à la cocaïne (Boudreau et al., 2007).

Au cours des deux paragraphes suivants, je détaillerai le rôle spécifique de certains substrats de ERK dans les modèles d'adaptations à long terme induites par les drogues d'abus.

## **6. Substrats cytoplasmiques de ERK**

Suite à son activation, ERK phosphoryle de nombreux substrats dans différents compartiments cellulaires, dont le noyau, le cytoplasme et la membrane plasmique (Grewal et al., 1999, Raman et al., 2007). La grande variété des cibles de ERK lui confère la capacité de réguler de multiples fonctions cellulaires et de moduler la plasticité neuronale au travers de nombreux mécanismes. Il est proposé que la voie ERK module la plasticité à court terme au travers de l'activation de cibles cytoplasmiques et membranaires alors que la phosphorylation de facteurs de transcription et de protéines nucléaires serait impliquée dans la régulation de la plasticité à long terme. Suite à son activation par les drogues, ERK, est détectée dans le soma et les dendrites et s'accumule rapidement dans le noyau (Valjent et al., 2000) (**Figure 10**). La présence de la forme active de la protéine dans ces différents compartiments cellulaires suggère fortement que ERK influence les réponses aux drogues en interagissant avec des substrats cytoplasmiques et nucléaires. Ce sont cependant les cibles nucléaires de ERK qui ont été les mieux décrites en réponse aux drogues et la voie ERK apparaît comme un acteur important pour les régulations géniques. Bien que moins décrites dans le contexte de l'addiction, les cibles cytoplasmiques de ERK sont également importantes pour la plasticité synaptique notamment dans l'hippocampe (Kelleher et al., 2004a). Ces mécanismes cytoplasmiques et indépendants de la transcription pourraient rendre compte du rôle de ERK

dans des régulations rapides de la plasticité synaptique et des réponses comportementales conditionnées. Dans cette section, je présenterai différents substrats cytoplasmiques de ERK décrits dans d'autres modèles de plasticité et dont il est envisageable qu'ils soient impliqués dans les adaptations neuronales induites par les drogues.



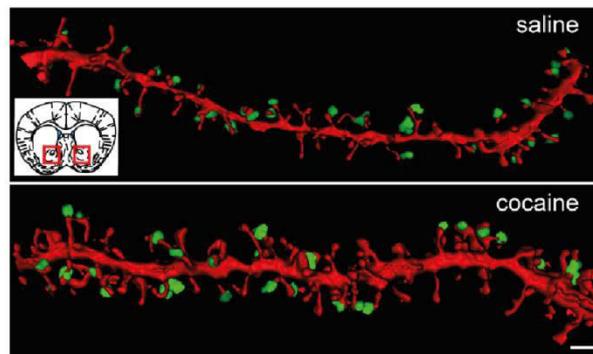
**Figure 10 : Accumulation nucléaire de la forme phosphorylée de ERK en réponse à une injection aiguë de cocaïne**

La forme phosphorylée de ERK est ici détectée par immunocytochimie dans le striatum de souris 5 min (Coc 5) ou 10 min (Coc 10) après une injection de cocaïne à 20 mg/kg. 5 min après l'injection, la majorité de neurones présentent un marquage majoritairement cytoplasmique (indiqué par les flèches noires) alors qu'à 10 min, la majorité des cellules présente un marquage nucléaire (indiqué par les flèches blanches)

#### a. Les protéines du cytosquelette

Parmi les cibles cytoplasmiques de ERK se trouvent des composants du cytosquelette tels que les protéines MAP (Microtubules Associated Protein), les neurofilaments ou encore les protéines Tau (Ray and Sturgill, 1988, Valjent et al., 2001). Dans les neurones, la régulation de la dynamique du cytosquelette est un processus important pour les changements de morphologie dendritique qui sous-tendent la plasticité des réseaux neuronaux. De telles adaptations structurelles sont observées en réponse aux drogues et pourraient rendre compte des altérations fonctionnelles qu'elles induisent dans les circuits de récompense (Russo et al., 2010). Dans le striatum, la cocaïne induit des changements de la morphologie et de la densité des épines dendritiques des MSN qui sont associés à une modification de l'efficacité synaptique (Robinson and Kolb, 1999, Heck et al., 2014) (Figure 11). Ces changements structurels au sein des MSN dépendent de l'activation de la voie ERK mais également de la stimulation des D1R et NMDAR (Ren et al., 2010). L'intégration des influx dopaminergiques et glutamatergiques au niveau des MSN apparaît comme un élément clé pour les adaptations morphologiques induites par les drogues (Yagishita et al., 2014). Si l'activation de la voie

ERK semble importante, les substrats cytoplasmiques impliqués dans ces remodelages structurels, directement ou indirectement, en aval de ERK restent peu connus. Des données issues d'autres modèles permettent d'envisager certains substrats et mécanismes d'actions potentiels. La spinophiline, une protéine phosphatase impliquée dans le remodelage dendritique est ciblée par ERK et sa phosphorylation est associée à une augmentation du nombre de filopodes (Futter et al., 2005). Dans le striatum, la spinophiline est impliquée dans la plasticité de la synapse cortico-striatale induite par la dopamine (Allen et al., 2006). ERK phosphoryle également des membres du complexe WR2 (WAVE2 Regulatory Complex) impliqué dans l'assemblage du cytosquelette d'actine (Mendoza et al., 2011). Ces protéines, importantes pour la régulation de la morphologie dendritique dans des neurones d'hippocampe (Ito et al., 2010), représentent des partenaires potentiels de ERK dans la régulation du cytosquelette au cours de la spinogénèse induite par les drogues.



**Figure 11 : Changement de la morphologie des épines dendritiques en réponse à des injections répétées de cocaïne**

L'arbre dendritique est ici analysé dans le striatum de souris knock-in Venus-VGLUT1, chez qui le transporteur au glutamate VGLUT1 est fusionné à une cassette Venus, permettant la visualisation des éléments pré-synaptiques glutamatergiques (vert). Les dendrites (rouge) marquées à l'aide d'un marqueur lipophile des membranes (Dyl) sont ici visualisées dans une reconstruction en 3 dimensions. Le couplage de ces deux marquages permet de visualiser les synapses glutamatergiques formées entre l'arbre dendritique du MSN( rouge) et le bouton pré-synaptique glutamatergique. Un traitement chronique à la cocaïne dans un protocole de sensibilisation locomotrice (6j, 20 mg/kg) augmente la densité d'épines dendritiques dans les MSN, associée à la formation de nouvelles connections glutamatergiques.

**b. Protéines membranaires**

L'activation de ERK participe également à la régulation de l'efficacité de la transmission synaptique au travers de la phosphorylation de cibles membranaires telles que des récepteurs

Tyrosine Kinase, des récepteurs ionotropiques ou encore des récepteurs couplés aux protéines G (Grewal et al., 1999). ERK est également impliquée dans la régulation de l'excitabilité des neurones pyramidaux de l'hippocampe au travers de la phosphorylation de certains résidus des canaux Kv4.2 (Adams et al., 2000, Schrader et al., 2006). ERK semble également impliquée dans la plasticité synaptique au travers de la régulation du trafic des récepteurs glutamatergiques de type AMPA (Alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor) et de leur recrutement à la synapse au cours de l'établissement de la LTP (Long-Term Potentiation) (Zhu et al., 2002, Qin et al., 2005, Patterson et al., 2010). ERK participe également à la régulation de l'adressage membranaire des AMPAR au travers de la phosphodiesterase 4 (Song and Tang, 2014). La voie ERK semble également contribuer à la régulation de l'efficacité synaptique au travers de cibles présynaptiques. La phosphorylation de la synapsine I en réponse à l'application de BDNF est notamment dépendante de l'activation de la voie ERK et contribue à la facilitation de la libération de glutamate par l'élément présynaptique (Jovanovic et al., 2000). La phosphorylation de la synapsine I par ERK tend à diminuer sa liaison à l'actine et facilite ainsi la mobilité des vésicules dans la zone active ainsi que leur probabilité de fusion à la membrane (Jovanovic et al., 1996). L'expression de la synapsine 1 est spécifiquement augmentée dans l'hippocampe chez le rat en réponse à un protocole d'induction de la LTP et pourrait être impliquée dans la modulation de la libération du glutamate au cours de la mise en place de la plasticité à long terme (Hicks et al., 1997).

### **c. Protéines cytoplasmiques**

Dans le cytoplasme, ERK est également impliquée dans les mécanismes de régulation de la traduction des ARNm. L'initiation de la traduction qui constitue l'étape limitante de la synthèse protéique est la cible d'un grand nombre de mécanismes de régulation. Au cours de cette étape d'initiation, le recrutement des ribosomes au niveau des ARNm peut se faire par deux mécanismes distincts. Les ribosomes peuvent être recrutés au niveau de séquences de type IRES (Internal Ribosomal Entries Sequences) présentes dans les messagers, selon un processus indépendant de la coiffe. Le second mécanisme, dépendant de la coiffe, consiste en un recrutement des ribosomes au niveau de la coiffe située dans la région 5' des ARNm et implique le facteur d'initiation de la traduction eIF4E (Costa-Mattioli et al., 2009). La voie ERK participe à la régulation de la synthèse protéique au travers de la phosphorylation de

cibles impliquées directement ou non dans l'initiation de la traduction. ERK participe notamment à l'activation par phosphorylation du complexe mTORC1 (**M**ammalian **T**arget **O**f **R**apamycin **C**omplex 1). Il peut agir sur ce complexe soit en activant, par phosphorylation, la protéine PDK1/2 (3-**P**hosphoinositide-**D**ependant protéine **K**inase 1/2), soit en phosphorylant et inactivant TSC2 (**T**uberous **S**clerosis **C**omplex 2) (Frodin et al., 2000, Ma et al., 2005). L'inactivation du complexe TSC1/TSC2 conduit à l'inactivation de Rheb et de mTORC1 aboutissant à une augmentation de la phosphorylation de 4E-BP qui entraîne la libération de eIF4E (Gingras et al., 1999). La libération d'eIF4E permet sa liaison à eIF4G et eIF4A pour former le complexe actif eIF4F impliqué dans l'initiation de la traduction. Il est proposé que les voies ERK et mTORC agissent en synergie dans la régulation de la traduction via eIF4E. ERK régule également la traduction au travers de l'activation de la kinase Mnk1 (**M**itogen-activated protéine kinase-interacting **k**inase**1**) qui phosphoryle eIF4E (Knauf et al., 2001, Ueda et al., 2004a). Dans l'hippocampe, la stimulation des NMDAR conduit à une augmentation du niveau de phosphorylation de Mnk1 et eIF4E qui dépend de l'activation de la PKA et de la voie ERK (Banko et al., 2004). Dans un protocole d'induction d'une LTP au niveau de la voie perforante de l'hippocampe, l'activation de la voie ERK conduit à une augmentation de la phosphorylation de Mnk1 qui, suite à son activation, phosphoryle à son tour eIF4E (Panja et al., 2009). Dans ce modèle, l'activation de la voie ERK/Mnk1/eIF4E est requise pour l'augmentation d'expression de la protéine Arc en réponse à l'induction de la LTP. Dans l'hippocampe, la régulation de la traduction par la voie ERK est cruciale pour l'établissement de la LTP et la consolidation de la mémoire (Kelleher et al., 2004a, Kelleher et al., 2004b). Dans les MSN, aucune cible cytoplasmique directe de ERK n'a été démontrée comme impliquée dans les altérations neuronales induites par les drogues.

## **7. Substrats nucléaires de ERK impliqués dans les adaptations neuronales induites par les drogues d'abus**

### **a. ERK et les régulations géniques induites par les drogues**

Dans les neurones, la voie ERK participe à la transmission du signal depuis la membrane jusqu'au noyau et contribue ainsi à un couplage efficace entre l'activité synaptique et la transcription dépendante de l'activité. Au travers de la phosphorylation de substrats

nucléaires, ERK régule l'activation rapide et spécifique de la transcription de gènes impliqués dans la mise en place d'une réponse neuronale appropriée. Dans des conditions basales, ERK est présent dans le cytoplasme sous sa forme non phosphorylée. La kinase de ERK, MEK, contient une signal d'export nucléaire (NES, **N**uclear **E**xport **S**ignal) et pourrait être responsable de la rétention cytoplasmique de la forme non phosphorylée de ERK. En effet, MEK dans son état inactif, non phosphorylé, est localisée dans le cytoplasme et possède une forte affinité pour son substrat ERK (Fukuda et al., 1997). L'activation de ERK par phosphorylation entraîne un changement de sa conformation et conduit à sa dissociation de MEK, nécessaire à sa translocation nucléaire (Wolf et al., 2001). En réponse à une stimulation glutamatergique, la translocation nucléaire de ERK dépend de son recrutement à des complexes protéiques contenant des marqueurs de l'endocytose clathrine-dépendante qui sont issus de l'endocytose des AMPAR (Trifilieff et al., 2009).

L'exposition aux drogues induit un programme transcriptionnel complexe au sein des neurones striataux. De nombreuses formes de plasticité neuronales impliquées dans l'apprentissage et la mémoire sont dépendantes de l'expression génique (Kandel, 2001). Dans les MSN, les modifications transcriptionnelles dépendent d'une synergie entre les mécanismes cellulaires en aval des D1R et des NMDAR (Konradi et al., 1996). En aval de ces signaux extracellulaires, la voie ERK semble jouer un rôle important dans la mise en place de ces régulations géniques induites par les drogues (Valjent et al., 2000, Ferguson and Robinson, 2004, Brami-Cherrier et al., 2005, Valjent et al., 2005, Piechota et al., 2010b). Suite à son activation par les drogues, ERK module de nombreuses réponses transcriptionnelles au travers de ses substrats nucléaires. ERK régule notamment l'expression de gènes immédiats précoces qui sont fortement impliqués dans la mise en place des réponses neuronales suite à une activité synaptique. Les gènes immédiats précoces, ou IEG (**I**mmEDIATE **E**ARLY **G**ENES) sont définis comme des gènes rapidement induits en réponse à une stimulation synaptique intense ou par des signaux chimiques tels que des neurotransmetteurs ou des facteurs de croissance. L'une des principales caractéristiques commune à ces gènes est le fait que l'induction rapide de leurs ARNm ne dépend pas nécessairement de la synthèse de nouvelles protéines (Sheng and Greenberg, 1990, Flavell and Greenberg, 2008). Un grand nombre de ces IEG, encodent des facteurs de transcription impliqués dans l'induction d'un programme génétique au travers de la transcription d'une seconde vague de gènes importants pour la mise en place d'adaptations cellulaires durables. Parmi ces IEG encodant des facteurs de transcription, on trouve notamment, c-fos, zif268, Jun-B ou encore FosB. Cependant, certains de ces IEG, tels

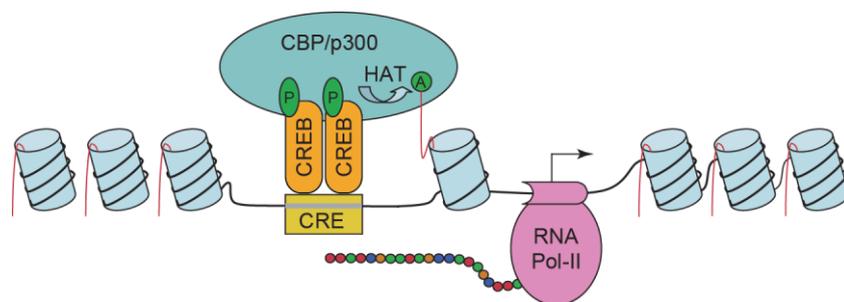
que *arc*, *homer1a* ou *narp* encodent des protéines qui ne sont pas des facteurs de transcription et interagissent directement avec des protéines préexistantes pour modifier la réponse neuronale.

Les drogues modifient l'expression de nombreux IEG dans différentes régions du système mésocorticolimbique. L'injection aiguë de cocaïne augmente notamment l'expression du gène *arc/arg3.1* encodant pour la protéine Arc (**A**ctivity-**R**egulated and **C**ytoskeleton associated protéine) qui fait l'objet du chapitre 3 de ce manuscrit (Fosnaugh et al., 1995). L'expression du gène *zif268* (**Z**inc **F**inger transcription factor 268 ou egr-1 **e**arly **g**rowth **r**esponse protéine 1) est augmentée dans le striatum en réponse à l'injection d'amphétamine ou de cocaïne (Moratalla et al., 1992). L'induction de ce gène par la cocaïne dépend de l'activation de la voie ERK (Radwanska et al., 2005) et s'avère essentielle pour les réponses à la cocaïne. En effet, son invalidation dans un modèle génétique *zif268* knock-out conduit à des altérations de la sensibilisation locomotrice ainsi que la CPP (Valjent et al., 2006b). La régulation des gènes encodant les facteurs de transcription de la famille Fos a été largement étudiée en réponse aux drogues (Graybiel et al., 1990, Moratalla et al., 1993). Cette famille comprend les facteurs de transcription *c-fos*, FosB, FosB et enfin Fra1 (**F**os-**r**elated **a**ntigen **1**) et Fra2 qui forment des dimères avec les protéines de la famille Jun pour constituer un complexe de facteurs de transcription nommé AP-1. Les gènes *c-fos* et *fosB* sont notamment induits dans le striatum dorsal et ventral en réponse à une injection aiguë de cocaïne (Graybiel et al., 1990, Moratalla et al., 1992). Si ces deux gènes sont fortement induits par une injection aiguë, l'administration chronique de cocaïne induit une tolérance qui conduit à une diminution de l'amplitude de leur induction. Cependant, la protéine  $\Delta$ FosB, une forme tronquée de la protéine FosB résultant d'un épissage alternatif tend, elle, à s'accumuler au cours d'un traitement chronique du fait notamment de sa stabilité (Chen et al., 2000, McClung et al., 2004, Larson et al., 2010).  $\Delta$ FosB intervient dans la régulation de nombreux gènes tels que NF $\kappa$ B ou Cdk5 qui sont tous deux augmentés par un traitement chronique à la cocaïne (Chen et al., 2000, Bibb et al., 2001, McClung and Nestler, 2003). La voie ERK régule l'expression de nombreux IEG induits par les drogues dans différentes régions des circuits de récompense (Valjent et al., 2000, Zhang et al., 2001, Brami-Cherrier et al., 2005, Jenab et al., 2005, Mattson et al., 2005, Radwanska et al., 2005, Radwanska et al., 2006). Les protéines ERK nucléaires influencent les mécanismes transcriptionnels en régulant l'activité de facteurs de transcription de façon directe ou indirecte. L'activation de ERK module également la structure de la chromatine au travers de la phosphorylation indirecte de certaines histones. Les substrats nucléaires de ERK sont

nombreux et ceux qui sont abordés dans cette partie ont été sélectionnés au regard de leur implication dans les régulations géniques induites par les drogues.

## b. Régulations transcriptionnelles via la kinase MSK-1

MSK-1 appartient à la famille des protéines MSK (Mitogen and Stress activated Kinase) qui sont activées par phosphorylation par les MAPK/p38 et les ERK (Deak et al., 1998). MSK-1 est enrichie dans le striatum (Heffron and Mandell, 2005). Suite à son activation par phosphorylation, MSK-1 catalyse, entre autres, la phosphorylation de la protéine CREB (Arthur and Cohen, 2000). CREB appartient à la famille des facteurs de transcription à leucine-zipper qui se lie à l'ADN via les séquences consensus CRE (cAMP Responsive Element). La phosphorylation de CREB sur son résidu Ser<sup>133</sup> induit son activité transcriptionnelle au niveau des promoteurs porteurs de sites CRE. L'activation de CREB conduit au recrutement de co-activateurs transcriptionnels tels que CBP (CREB Binding Protéine), p300 ou encore CRCT1 qui sont requis pour l'activation de la transcription (Kwok et al., 1994, Parker et al., 1996). La protéine CBP contribue à l'initiation de la transcription via sa liaison à la RNA Pol-II (ARN Polymerase II) qui favorise son recrutement au niveau du promoteur (Kee et al., 1996). La CBP favorise également l'initiation de la transcription au travers de son activité acétyl-transférase qui est impliquée dans la décompaction locale de la chromatine requise pour le recrutement de la machinerie transcriptionnelle (Mayr and Montminy, 2001) (Figure 12). CREB n'est pas uniquement ciblé par ERK et de nombreuses protéines kinases dépendantes de l'AMPc (PKA) ou du calcium et de la calmoduline (CAMK II ou IV, Calcium calmodulin-dépendant kinase de type II ou IV) peuvent également phosphoryler le résidu Ser<sup>133</sup> de CREB.



## Figure 12 : Représentation schématique de l'activation transcriptionnelle dépendante de CREB

La phosphorylation des dimères de CREB sur le résidu Ser<sup>133</sup> active une cascade d'évènements qui implique le recrutement de protéines associées telles que le co-activateur transcriptionnel, CBP/p300. Ces évènements aboutissent à l'assemblage du complexe transcriptionnel. Ce complexe participe au remodelage de la chromatine au travers du recrutement de protéines HAT (Histones Acetyl Transferase) telles que CBP mais aussi d'autres protéines impliquées dans la régulation de la liaison entre la chromatine et les histones (cylindres bleus). Les traits rouges représentent les queues N-terminales des histones qui peuvent subir des modifications post-traductionnelles telles que l'acétylation. L'ensemble de ces mécanismes favorisent la synthèse d'ARN par la RNA Pol-II. (Carlezon et al., 2005).

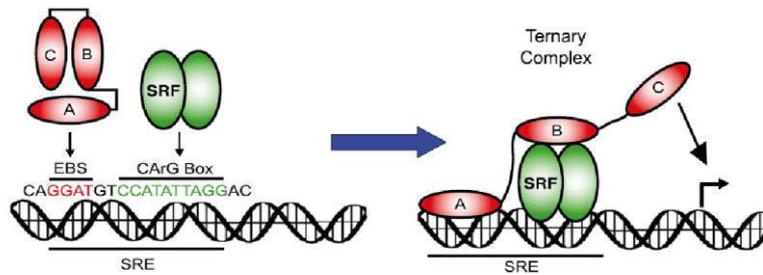
Dans les neurones striataux, les niveaux de phosphorylation de MSK-1 (Thr<sup>581</sup>) et de CREB (Ser<sup>133</sup>) sont augmentés en réponse à une injection de cocaïne (Brami-Cherrier et al., 2005). L'activation de ces deux protéines dépend de ERK puisque chacune d'elle est abolie en présence du SL327, un inhibiteur de MEK. L'activation de CREB par la cocaïne n'est pas retrouvée chez des souris *msk-1* KO et semble donc dépendre de l'activation de MSK-1 en aval de ERK. (Brami-Cherrier et al., 2005). Bien que la phosphorylation de CREB sur le résidu Ser<sup>133</sup> soit la cible de nombreuses kinases telles que RSK1/2, CAMK IV ou PKA, son activation dans le striatum, en réponse à la cocaïne dépend majoritairement de MSK-1 (Brami-Cherrier et al., 2005, Mattson et al., 2005). Comme nous l'avons vu, l'activation de CREB conduit à son association à des protéines co-activatrices telles que la CBP, importantes pour le recrutement de la machinerie transcriptionnelle et l'induction de gènes. Le facteur de transcription CREB est régulé par de nombreuses drogues et participe à la régulation transcriptionnelle de nombreux gènes importants pour la mise en place de la plasticité induite par les drogues (McClung and Nestler, 2008). L'abolition génétique de *msk-1* est associée à des modifications du programme génique induit par la cocaïne et notamment à une perte de l'induction des gènes immédiats précoces c-Fos et dynorphine dont l'expression est normalement augmentée en réponse à cette drogue. L'induction par la cocaïne du gène immédiat précoce *zif268* est en revanche préservée chez ces animaux (Brami-Cherrier et al., 2005). La protéine MSK-1 est également impliquée dans la phosphorylation de résidus spécifiques des histones H1, H2B, H3 et d'une protéine non-histone liée aux nucléosomes, HMG-14 (High Mobility Group-14) (Thomson et al., 1999a). De tels évènements jouent un rôle important dans le remodelage de la chromatine qui contribue à l'initiation de la transcription (Thomson et al., 1999b). Dans les neurones striataux, l'activation de MSK-1 en aval de ERK catalyse la phosphorylation des histones H3 sur leur résidu Ser<sup>10</sup> (Brami-Cherrier, 2005 ; 2007 ; 2009). Une autre protéine activée en aval de ERK, la kinase RSK-2 (Ribosomal S6 Kinase 2) présente des propriétés similaires à celles de MSK-1. En effet, RSK-

2 est également impliquée dans la phosphorylation de CREB (Xing et al., 1996) ainsi que des résidus Ser<sup>10</sup> des histones H3 (Sassone-Corsi et al., 1999, Crosio et al., 2000). D'autres kinases sont impliquées dans la phosphorylation des histones H3 sur leur sérine 10, telles que la PKC (**P**rotein **K**inase **C**), IKK $\alpha$  (I $\kappa$ B Kinase  $\alpha$ ) ou encore AKT1.

L'activation de MSK-1 en aval de ERK est également impliquée dans l'augmentation du niveau de phosphorylation des histones H3 (Ser<sup>10</sup>) induit en réponse à une injection de cocaïne (Brami-Cherrier et al., 2005). Les modifications post-traductionnelles des histones contribuent à la décompaction de l'ADN requise pour le recrutement de la machinerie transcriptionnelle. L'augmentation du niveau de phosphorylation des histones H3 est associée à une activation de la transcription (Brami-Cherrier et al., 2009). Chez les souris *msk-1 KO*, la perte de phosphorylation des histones H3 en réponse à l'injection de cocaïne est associée à une perte de l'induction de gènes immédiats précoces tels que c-Fos et la dynorphine (Brami-Cherrier et al., 2005). Ces réponses moléculaires sont associées à des modifications des réponses comportementales induites par la cocaïne. Les souris *msk-1 KO* présentent une altération de la sensibilisation locomotrice alors que la préférence de place conditionnée est augmentée chez ces animaux. Ces données sont en accord avec l'implication de CREB et de la dynorphine dans les effets aversifs des drogues (Carlezon et al., 2005).

### c. Regulations transcriptionnelles via Elk-1

Dans le noyau, ERK phosphoryle la protéine Elk-1. Cette protéine est un facteur de transcription à domaine Ets qui appartient à la famille des TCF (**T**ernary **C**omplex **F**actor) (Hipskind et al., 1991). Les facteurs de transcription de type TCF s'associent à des dimères de protéines SRF (**S**erum **R**esponsive **F**actor) pour former un complexe protéique qui se lie à l'ADN au niveau de séquences consensus de type SRE (**S**erum **R**esponsive **E**lement) (**Figure 13**) (Treisman, 1996). La fixation à haute affinité de Elk-1 au niveau des sites SRE dépend de sa liaison aux protéines SRF. Elk-1 est directement phosphorylé par ERK sur les sérines 383 et 389 (Gille et al., 1995). La phosphorylation de Elk-1 au niveau de ces deux résidus est déterminante pour l'activation transcriptionnelle via les sites SRE présents dans les promoteurs de nombreux IEG tels que *c-fos*, *zif268* ou *junB* (Janknecht et al., 1993, Treisman, 1995).



### Figure 13 : Représentation schématique de la formation du complexe TCF

Le dimère SRF interagit avec la séquence consensus de type SRE ou *CArG box* (CC[A/T]<sub>6</sub>GG). Le domaine A (domaine Ets) du TCF se lie à la séquence consensus de type EBS. Les séquences EBS et CArG représentées ici correspondent au site SRE du promoteur de *c-fos*. Le domaine B du TCF contient l'interface impliquée dans l'interaction avec le SRF et le domaine C, les résidus Serine ciblés par les protéines ERK activées. (Buchwalter et al., 2004)

L'activation de Elk-1 en aval de ERK est également un événement important pour les réponses transcriptionnelles induites par les drogues. Dans les MSN, le facteur de transcription Elk-1 est phosphorylé par ERK en réponse à une injection aigüe de cocaïne ou d'amphétamine (Valjent et al., 2000, Choe et al., 2002). La phosphorylation de Elk-1, par ERK, sur ses résidus Ser<sup>383/389</sup> conduit à sa translocation nucléaire (Lavaur et al., 2007). L'utilisation d'un peptide interférant capable d'inhiber sélectivement la phosphorylation de Elk-1 a révélé que son activation est essentielle pour les réponses moléculaires ainsi que le développement de la sensibilisation locomotrice et de la CPP induites par la cocaïne (Besnard et al., 2011). De manière intéressante, l'inhibition de Elk-1 conduit à une diminution de la phosphorylation des histones H3 en réponse à la cocaïne sans altérer la phosphorylation de MSK-1. Ces données indiquent que Elk-1, sous sa forme active, pourrait agir au sein du noyau, comme une protéine d'échafaudage pour le recrutement de MSK-1 au niveau de l'ADN (Zhang et al., 2001). Le facteur de transcription Elk-1 exerce une régulation sur la transcription d'IEG tels que *junB*, *zif268* ou *Nur77* et son inhibition entraîne une diminution partielle de l'induction par la cocaïne des gènes *c-fos*, *zif268* ou encore *arc* dans le striatum. Ces changements d'expression génique sont associés à une diminution de la sensibilisation locomotrice ainsi que de la préférence de place conditionnée (Besnard et al., 2011).

#### d. Régulations épigénétiques induites par les drogues

La régulation de la transcription ne repose pas uniquement sur l'activation des voies de signalisation et de facteurs de transcription mais dépend également de modifications de la

structure de l'ADN. Dans le noyau des cellules, l'ADN est étroitement compacté et s'associe avec de nombreuses protéines pour former un complexe hautement organisé appelé chromatine. Le niveau de compaction de la chromatine est déterminant pour l'initiation de la transcription puisqu'il conditionne l'accessibilité de l'ADN aux protéines chargées de sa transcription. A l'état basal, la chromatine hautement compactée est inaccessible à la machinerie transcriptionnelle alors que sa décompaction favorise sa fixation à l'ADN. Cet état de compaction est notamment contrôlé par les histones, des protéines basiques intimement liées à l'ADN qui jouent un rôle central dans l'organisation de la chromatine (Li et al., 2007). Les changements de conformation de la chromatine dépendent notamment de modifications post-traductionnelles des histones qui vont moduler leur niveau d'interaction à l'ADN. Les histones sont soumises à diverses modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation, l'acétylation ou encore la méthylation et l'ubiquitination qui vont influencer la transcription de différentes manières (Bannister and Kouzarides, 2011). L'épigénétique fait référence à ces mécanismes qui modulent l'expression des gènes en amont de l'information portée par la séquence du gène. Ces mécanismes moléculaires sont affectés par les drogues et apparaissent comme des processus importants pour la mise en place d'adaptations neuronales durables observées dans l'addiction (Walker et al., 2015)

Les modifications post-traductionnelles des histones induites par les drogues sont responsables de nombreuses altérations transcriptionnelles (Renthal and Nestler, 2008, Maze et al., 2010). L'induction de *c-fos* et *fosB* par la cocaïne est notamment associée à une augmentation de l'acétylation des histones H4 au niveau de leur promoteur (Kumar et al., 2005). Les histones déacétylases (HDAC) sont les enzymes impliquées dans la déacétylation des histones qui promeut la compaction de la chromatine et, par conséquent, est généralement associée à une inhibition de la transcription. L'inhibition de ces enzymes augmente l'effet locomoteur et récompensant de la cocaïne alors que leur surexpression diminue la CPP (Kumar et al., 2005, Renthal et al., 2007). La voie ERK est impliquée dans ces mécanismes de remodelage de la chromatine via notamment la kinase MSK-1. Nous avons vu précédemment que la voie ERK contrôle la phosphorylation des histones H3 induite par la cocaïne (Brami-Cherrier et al., 2005). La phosphorylation des histones favorise la transcription en participant à la décompaction de la chromatine. En effet, chez les souris *msk-1* ko, la perte de phosphorylation des histones est associée à une perte de l'induction des IEG *c-fos* et dynorphine (Brami-Cherrier et al., 2005, Jordi et al., 2013) Dans le striatum, les réponses épigénétiques induites par la cocaïne sont spécifiques du type cellulaire et dépendent de la

durée de l'exposition à la drogue. (Jordi et al., 2013) Bien que certains résidus soient communément altérés, le patron des modifications post-traductionnelles des histones se révèle différent au sein des D1-MSN et les D2-MSN. Les réponses observées dans ces populations sont également affectées différemment par un traitement aigu ou chronique. Ces données démontrent la spécificité de ces réponses épigénétiques et suggèrent qu'elles jouent un rôle important dans la mise en place d'un programme transcriptionnel spécifique. (Jordi et al., 2013)

L'activation de la voie ERK par les drogues joue un rôle essentiel dans la mise en place d'un programme transcriptionnel complexe au sein des MSN. Ces régulations géniques sont centrales pour les réponses moléculaires et comportementales induites par les drogues. Les gènes induits au cours de ces régulations sont impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires importantes pour la mise en place d'adaptations neuronales durables. Parmi, ces gènes, nous avons évoqué le gène *arc*, induit dans le cortex et le striatum en réponse à la cocaïne. Les modalités de régulation de cet IEG ainsi que ses fonctions dans la plasticité neuronale et les adaptations comportementales à long terme sont abordées de manière détaillée dans le chapitre suivant.