



HAL
open science

Caractérisation des propriétés motivationnelles du sevrage des opiacés - analyse comparative des substrats neurobiologiques des effets inconditionnés et conditionnés

François Frenois

► **To cite this version:**

François Frenois. Caractérisation des propriétés motivationnelles du sevrage des opiacés - analyse comparative des substrats neurobiologiques des effets inconditionnés et conditionnés. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Victor Segalen - Bordeaux II, 2003. Français. NNT : . tel-00006055

HAL Id: tel-00006055

<https://theses.hal.science/tel-00006055>

Submitted on 11 May 2004

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

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

Université Victor Segalen Bordeaux 2
UFR Sciences de la Vie

Année 2003

Thèse n°1039

THÈSE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2

Mention : Sciences Biologiques et Médicales
Option : Neurosciences et Pharmacologie

Présentée et soutenue publiquement le 21 octobre 2003

par

François FRENOIS

Né le 05 juillet 1973 à Bourges (18)

**CARACTERISATION DES PROPRIETES
MOTIVATIONNELLES DU SEVRAGE DES OPIACES**

Analyse Comparative des Substrats Neurobiologiques des
Effets Inconditionnés et Conditionnés

Membres du Jury

Mr Bernard Bioulac – Université Bordeaux 2, Bordeaux	Président
Me Brigitte Kieffer – CNRS UMR 7104, Strasbourg	Rapporteur
Mr Georges Di Scala – CNRS UMR 5106, Bordeaux	Rapporteur
Mr Rafael Maldonado – Université Pompeu Fabra, Barcelone	Examineur
Mlle Martine Cador – CNRS UMR 5541, Bordeaux	Examineur
Mlle Catherine Le Moine – CNRS UMR 5541, Bordeaux	Directrice de thèse

*à mes p'tits Kokolos,
Lejla, Etan...*

I got my head, but my head is unraveling
Can't keep control, can't keep track of where it's traveling
I got my heart, but my heart's no good
And you're the only one that's understood
I come along, but I don't know where you're taking me
I shouldn't go, but you're wrenching, dragging and snaking me
Turn off the sun, pull the stars from the sky
The more I give to you, the more I die

And I want you, and I want you...
You are the perfect drug...

You make me hard, when I'm all soft inside
I see the truth, when I'm all stupid-eyed
The arrow goes straight through my heart
Without you everything just falls apart

My blood just wants to say hello to you
My fear is warm to get inside of you
My soul is so afraid to realize
How every little bit is left of me

Take me with you
Without you everything just falls apart
It's not as much fun to pick up the pieces

Trent Reznor, "The Perfect Drug"

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été réalisé dans l'UMR CNRS 5541 « Interactions neuronales et comportements », dirigée par Monsieur le Professeur *Bertrand Bloch*, à qui j'adresse ma plus profonde reconnaissance pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et ainsi m'avoir permis de réaliser ce travail passionnant.

Je voudrais exprimer ici ma plus sincère gratitude au Docteur *Catherine Le Moine*, qui a dirigé l'ensemble de ce travail avec rigueur et patience, ainsi qu'au Docteur *Martine Cador*, sans qui ce projet n'aurait certainement pas pu voir le jour. Soyez assurées, Catherine, Martine, de toute ma reconnaissance, pour m'avoir fait confiance et encouragé tout au long de ces années, et surtout pour m'avoir laissé une grande liberté de pensée et d'expression (vive les « functional models » !!!), ainsi qu'une totale autonomie dans l'organisation et la réalisation de mes travaux. Catherine, je te remercie profondément pour m'avoir donné ma chance en m'acceptant au sein de ton équipe, pour la qualité de ton encadrement tant sur le plan scientifique qu'humain, pour ton enthousiasme, ta disponibilité, ton attention, et tout le reste... Martine, tes encouragements constants, ta disponibilité sans faille, et ton regard de « comportementaliste » ont été pour moi une aide précieuse et une source d'équilibre pour la réalisation de ce travail. Nos discussions, souvent interminables, et nos « prises de tête » scientifiques vont me manquer... ou pas ?!! Avec toute mon estime. Merci à vous deux.

Je suis profondément reconnaissant aux Docteurs *Brigitte Kieffer* et *Georges Di Scala* de m'avoir fait l'honneur d'accepter de me consacrer du temps et de porter leur jugement expert sur ce travail. Je tiens également à exprimer toute ma gratitude au Professeur *Rafael Maldonado* pour avoir eu l'amabilité d'accepter de juger ce travail en tant qu'examineur. Enfin, je suis particulièrement honoré et ravi que Monsieur le Professeur *Bernard Bioulac* ait accepté de présider mon jury de thèse.

Un grand merci au Docteur *Luis Stinus*, pour ses conseils avisés, son implication et son intérêt certain pour ce travail, pour sa gentillesse, et son vin d'oranges... Merci à toi *Stéphanie* pour m'avoir appris à dorloter mes p'tits rats et pour m'avoir initié aux « joies » de l'aversion de place conditionnée : profite bien de ton bout d'choux sous le soleil de San Diego. Merci aux autres *François* (*Georges* et *Gonon*), à *Nico* et ses abeilles (t'inquiètes, t'as encore un peu de temps !), à *Marion* (toi, par contre, t'as plus du tout de temps !... bonne chance pour ta soutenance) et à *Marianne* (la grande sœur, qui a maintenant tout son temps, sur sa banquise !), pour leur soutien, leur bonne humeur et les pauses clopes dans le couloir.

Merci à *Lydie*, pour avoir bichonné mes petits rats, et à *Pierrot* le bricolo pour sa bonne humeur. Une pensée particulière pour *Marie-Laure MeLeMeNe* (promis, je quitte ton bureau bientôt !), *Sébastien* (merci pour les CD), ainsi que pour *Marie-Christine* (la reine du plasmide et de la bio mol), *Evelyne* (la grande prêtresse de la microscopie électronique), *Véronique*, *Brigitte*, *Giselle*, *Carita* et *Elisabeth*, pour leur sympathie et leur gentillesse.

Je tiens également à remercier les z'étudiants actuels et passés qui ont sévis au LNPPB : *Servane*, *Delphine* (et non, j'ai pas oublié le DEA), *Amandine*, *Sylvia*, la pitite *Karine*, et la grande *Carine*. Tu ne trouves pas ça bizarre *Luis* ?... que des filles...

Merci *Greg* et *Fanny*. Hé oui, bien que ce soit la banlieue du Médoc, Bordeaux c'est pas bien... mais c'est pas grave. Votre amitié nous a bien aidé à faire passer la pilule. A nos prochaines p'tites bouffes (je te promet *Greg*, *Lelie* ne referra plus de fondant au chocolat !).

A mes vieux compagnons d'armes Toulousains, *Greg el' Stupiensky* (t'inquiètes, tu lui vendras tes sujets à *Mac Lesggy*), ta p'tite femme *Marie-Laure*, *Pat* et *Yann les Bonobs* (et bien sûr leurs animaux, *Flicka*, les *Moutons*, etc...), *Caca* (alors les gencives, ça colle ?!!), *Magaloche*, *Vaness'* et *JB* (hé non, c'est pas le whisky). Faisons que notre amitié résiste au temps qui passe et aux kilomètres qui nous séparent... A toi, *Raymond Campan*, pour m'avoir tant apporté et donné l'envie de tenter cette grande aventure.

Je ne saurais bien évidemment oublier nos potes du *Chat Dingue*, et en particulier *Jean-Luc*, *Alisque* et ses pouces, qui maintenant se goinfre de *große wurst* (lâcheuse !!!), le grand *JT*, et *Xav'* – dit, *Tou le dingue*.

Mes pensées finales reviendront à *ma mère* et *mon père* qui m'ont soutenus pendant toutes ces années, chacun à leur manière, et sans qui je n'aurait pas pu aller au bout de mes projets... ainsi qu'à l'ensemble de ma famille et de ma belle famille : *Mamie*, *Beba* et *Bešo*, *Tetka* et *Bruno*, *Bato* (*nadam se da češ razumjeti this manuscript*), tous les d'jeunes (*Alma* et *Vince*, *Laurence* et *Julien* (dit, *Majmun* ou *Papy*), *Manne*, *Erol*, *Maja*, les cousins du *Bled*, et *Mathilde*), les moins d'jeunes (*Manu* et *Bénédicte*, *Sabine* et *Stéph*), et les très d'jeunes (*Clément*, *Alice*, et la future petite *Leya*). Sans votre soutien, les *Barbec* bien arrosés chez *Tetka* et *Bruno*, et les vacances au *Bled* (aussi bien arrosées) avec entre autre les *čevapi* et les *pita*, je serai peut-être devenu fou... Merci.

Cette thèse t'es dédiée, à toi, *Lejla*, qui a toujours été à mes côtés pour me soutenir, m'encourager... Sans toi, je ne serais certainement pas entrain d'écrire ces lignes. Je n'ai pas de mots pour te dire à quel point je te remercie, pour tout. Mais, tu le sais, le plus beau est à venir pour nous... trois !!! Il nous reste la vie entière pour en profiter. Merci mon *Kokolo*...

RÉSUMÉ - ABSTRACT



RÉSUMÉ

L'addiction correspond à un désordre psychobiologique caractérisé par une tendance chronique à la rechute, et implique des processus d'ordre motivationnels et émotionnels qui mettent en jeu des phénomènes d'apprentissage et de mémoire affective. Chez le toxicomane abstinent, la présentation de situations environnementales précédemment associées à l'expérience du sevrage des opiacés est capable d'induire un intense désir pour la drogue (« *craving* »), et il a été proposé que ces stimuli conditionnés pourraient précipiter la rechute en réactivant les circuits neuronaux qui sont mis en jeu de manière inconditionnée par le sevrage. Dans ce contexte, nous avons entrepris la caractérisation de la composante motivationnelle du sevrage des opiacés en utilisant des modèles comportementaux (sevrage précipité par des faibles doses de naloxone chez le rat morphino-dépendant, réexposition à des stimuli environnementaux précédemment associés au sevrage dans un modèle d'aversion de place conditionnée) qui permettent d'évaluer les propriétés aversives et motivationnelles du sevrage, aussi bien sur le versant inconditionné que conditionné. Nous avons ainsi recherché les substrats neurobiologiques impliqués dans ces phénomènes en « traçant » de manière extensive les circuits neuronaux recrutés, en terme de localisation et de populations neuronales, par une approche de neuroanatomie fonctionnelle utilisant la détection du marqueur de réactivité neuronale *c-fos* par hybridation *in situ*.

D'une manière générale, nos résultats montrent que les substrats neuronaux sous-jacents à la composante motivationnelle du sevrage – qui incluent en particulier les structures de l'« *extended amygdala* » (noyau accumbens partie médiale shell, noyau du lit de la strie terminale et noyau central de l'amygdale) et les régions limbiques qui lui sont associées (noyau basolatéral de l'amygdale, hippocampe, septum latéral et aire tegmentale ventrale) – peuvent être dissociés d'un ensemble d'autres régions cérébrales qui sont en revanche impliquées dans l'expression de la symptomatologie somatique du sevrage.

Au niveau de l'aire tegmentale ventrale (VTA), notre analyse phénotypique des neurones recrutés au cours du sevrage précipité par la naloxone (situation inconditionnée) et lors de la présentation de stimuli environnementaux associés au sevrage (situation conditionnée) montre une induction massive dans la population des interneurons GABAergiques. Bien qu'une telle activité GABAergique est supposée être capable d'inhiber en grande partie les neurones dopaminergiques, nous montrons également qu'une sous-population de neurones dopaminergiques de la VTA (environ 15%) est activée dans ces deux situations.

Au niveau de l'amygdale, nos résultats montrent l'existence d'une double dissociation anatomique et fonctionnelle dans la réponse globale des noyaux central (CeA) et basolatéral (BIA) en terme d'expression de *c-fos* entre les situations inconditionnée et conditionnée. Dans le BIA, bien que le sevrage précipité par la naloxone induise une diminution de l'activité de la majorité des neurones efférents glutamatergiques, une sous-population de ces neurones montre une intense induction de l'ARNm *c-fos*. La réexposition aux stimuli conditionnés au sevrage provoque quant à elle une intense activation dans de nombreux neurones glutamatergiques du BIA. Dans les neurones GABAergiques du CeA, les réponses *c-fos* sont opposées aux réponses globales du BIA, puisque l'expression de *c-fos* dans ces neurones est augmentée dans la situation inconditionnée, alors qu'elle est diminuée dans la situation conditionnée.

Nous proposons que le pattern d'expression de *c-fos* que nous détectons dans l'ensemble de ces structures limbiques pourrait refléter ① la mise en place de processus d'apprentissage associatif permettant d'encoder la valeur affective et motivationnelle des stimuli environnementaux associés au sevrage de la morphine, dans la situation inconditionnée, et ② le rappel et l'expression des associations mémorisées au cours du conditionnement, dans la situation conditionnée (« mémoire du sevrage »). Ainsi, sur la base de l'ensemble de nos résultats et de nombreuses données de la littérature, nous proposons un modèle fonctionnel pour la formation et le rappel de la « mémoire du sevrage des opiacés ».

Mots-clés : rat, comportement, apprentissage et mémoire, aversion de place conditionnée, sevrage des opiacés, hybridation *in situ*, cartographie *c-fos*, « *extended amygdala* », aire tegmentale ventrale (dopamine), noyaux central et basolatéral de l'amygdale.

ABSTRACT

Addictive behaviors are pathological states characterized by a loss of control over drug consumption and by a persistent vulnerability to relapse following abstinence from repeated drug use. Addiction involves motivational and emotional processes as well as associative-learning and affective memory. In former opiate addicts, re-exposure to environmental situations previously paired with withdrawal is able to induce strong craving episodes, and it has been proposed that these conditioned stimuli could be strongly involved in precipitating relapse in drug-taking behavior by re-activating the neurobiological networks which is engaged in an unconditioned manner by the withdrawal state itself. In this context, we have focused on the characterization of the motivational component of morphine withdrawal, by using behavioral models (naloxone-precipitated withdrawal using low doses in morphine-dependent rats, re-exposure to morphine withdrawal-paired environmental stimuli in a conditioned place aversion paradigm), which allow to assess the aversive and motivational properties of opiate withdrawal, both in the unconditioned and conditioned situations. Using these models, we have investigated the neuronal correlates of these processes, using extensive mapping of the neurobiological substrates recruited, in terms of localization and neuronal population, with an anatomical and functional approach using the detection of *c-fos* as a marker of neuronal reactivity, by *in situ* hybridization.

On the whole, our results show that the neurobiological substrates underlying the motivational component of opiate withdrawal – which include in particular the structures of the extended amygdala (nucleus accumbens medial shell part, bed nucleus of the stria terminalis and central nucleus of the amygdala) and its associated limbic territories (basolateral nucleus of the amygdala, hippocampus, lateral septal nucleus and ventral tegmental area) – can be dissociated from a number of other cerebral structures, which, in contrast, are involved in the expression of the overt somatic symptoms of withdrawal.

Within the ventral tegmental area (VTA), our phenotypical analysis of the neuronal populations which are recruited following naloxone-precipitated morphine withdrawal (unconditioned situation) and after re-exposure to withdrawal-paired environmental stimuli (conditioned situation) show an intense induction of the majority of GABAergic interneurons. Although such GABAergic activity should lead to dopaminergic neurons inhibition, we also demonstrate that a subset of the VTA dopaminergic neurons (about 15%) is activated in both the unconditioned and conditioned situations.

Within the amygdala, our results show an anatomical and functional double-dissociation in the global response of the central (CeA) and basolateral (BIA) nuclei of the amygdala in terms of *c-fos* mRNA expression between the unconditioned and conditioned situations. In the BIA, although acute naloxone-precipitated withdrawal decreased *c-fos* expression in the majority of glutamatergic efferent neurons, a subpopulation of these neurons exhibited decreased *c-fos* mRNA expression. In contrast, re-exposure to withdrawal-conditioned stimuli enhanced *c-fos* expression in a large number of BIA glutamatergic efferents. Within GABAergic neurons of the CeA, *c-fos* responses were opposite to the global responses measured in the BIA, as *c-fos* mRNA expression in these neurons is increased in the unconditioned situation, whereas it is decreased in the conditioned situation.

Altogether, our results emphasize that the pattern of *c-fos* mRNA expression that we detect within all these interconnected limbic structures could reflect ① the onset of associative-learning processes aimed to encode the incentive-value of morphine withdrawal-associated environmental stimuli, in the unconditioned situation, and ② the retrieval and expression of learned-associations, in the conditioned situation (withdrawal memories). Therefore, on the basis of our results, and together with a number of data in the literature, we propose a functional model for the acquisition and the retrieval of morphine withdrawal memories.

**PUBLICATIONS ET
COMMUNICATIONS**

PUBLICATIONS & COMMUNICATIONS

PUBLICATIONS

Frenois F., Stinus L., Di Blasi F., Cador M., Le Moine C. (2003) *Neural circuits underlying opiate withdrawal memories. II. Phenotypical characterization shows differential involvement of subpopulations of VTA and amygdaloid neurons.* **J Neurosci** Soumis : #JN-RM-3195-03.

Frenois F., Stinus L., Le Moine C., Cador M. (2003) *Neural circuits underlying opiate withdrawal memories. I. C-fos imaging dissociates between acute withdrawal experience and re-exposure to a withdrawal-paired environment.* **J Neurosci** Soumis : #JN-RM-3193-03.

Frenois F., Cador M., Caillé S., Stinus L., Le Moine C. (2002) *Neural correlates of the motivational and somatic components of naloxone-precipitated morphine withdrawal.* **Eur J Neurosci** (16-7) 1377-1389.

COMMUNICATIONS AFFICHEES (POSTERS)

Frenois F., Cador M., Stinus L., Le Moine C. (2003) *Neural networks underlying opiate withdrawal memories.* **International Narcotics Research Conference (INRC), Perpignan France, 06-11 juillet.**

Frenois F., Cador M., Stinus L., Le Moine C. (2003) *Circuits neuronaux engagés par le rappel d'événements aversifs associés au sevrage des opiacés.* **3^{ème} Journée Scientifique de l'Ecole Doctorale « Sciences Biologiques et Médicales », Arcachon France, 2 avril.**

Frenois F., Cador M., Stinus L., Le Moine C. (2002) *Caractérisation et différenciation des effets motivationnels et physiques du sevrage des opiacés : analyse comparative des substrats cellulaires et moléculaires des effets inconditionnés et conditionnés.* **ADERA, Doctoriales[®] des Universités d'Aquitaine, Gujan-Mestras France, 22-27 septembre.**

Frenois F., Cador M., Stinus L., Le Moine C. (2002) *Double dissociation within the amygdaloid complex in the neural substrates underlying the unconditioned and conditioned effects of opiate withdrawal.* **3rd forum of European Neuroscience (FENS), Paris France, 13-17 juillet. Bourse de la Société des Neurosciences.**

Frenois F., Cador M., Stinus L., Le Moine C. (2002) *Réponses neuronales opposées des noyaux central et basolatéral de l'amygdale au cours des effets inconditionnés et conditionnés du sevrage des opiacés.* **2^{ème} Journée Scientifique de l'Ecole Doctorale « Sciences Biologiques et Médicales », Arcachon France, 10 avril.**

Frenois F., Cador M., Stinus L., Le Moine C. (2001) *Unconditioned and conditioned effects of opiate withdrawal: analysis of c-fos mRNA expression in the rat brain.* **1st joint meeting of the European Behavioural Pharmacology Society (EBPS) and European Brain and Behaviour Society (EBBS), Marseille France, 8-12 septembre. Bourse de la Communauté Européenne.**

Frenois F., Cador M., Stinus L., Le Moine C. (2001) *Effets inconditionnés et conditionnés du sevrage des opiacés : analyse anatomo-fonctionnelle comparative de l'expression de c-fos.* **5^{ème} Colloque de la Société des Neurosciences, Toulouse France, 19-31 mai.**

COMMUNICATIONS ORALES

Stinus L., Le Moine C., Georges F., Frenois F., Ahmed S., Cador M. (2003) *Drug addiction, from acute to protracted effects.* **International Narcotics Research Conference (INRC), Perpignan France, 06-11 juillet.**

Stinus L., Caillé S., Le Moine C., Frenois F., Georges F., Cador M. (2003) *Implication of locus caeruleus NA neurons in opiate dependence and therapeutic effects of clonidine.* **First European Congress On Addictive Disorders, Alicante Spain, 26-29 mars.**

Cador M., Frenois F., Cretton C., Stinus L., Le Moine C. (2001) *Neural correlates of withdrawal memories.* **1st joint meeting of the European Behavioural Pharmacology Society (EBPS) and European Brain and Behaviour Society (EBBS), Marseille France, 8-12 septembre.**

TABLES ET INDEX

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	4
RÉSUMÉ	7
ABSTRACT	8
PUBLICATIONS & COMMUNICATIONS	10
TABLE DES MATIÈRES	12
INDEX DES FIGURES & TABLEAUX	16
ABRÉVIATIONS	18
<hr/>	
INTRODUCTION GÉNÉRALE	20
<hr/>	
I. CADRE GENERAL ET HYPOTHESES DE TRAVAIL	20
II. DEPENDANCE ET SEVRAGE DES OPIACÉS	23
II.1. Opiacés et systèmes opioïdes endogènes	23
II.1.1. <i>L'opium et ses dérivés, historique</i>	23
II.1.2. <i>Les récepteurs opioïdes</i>	25
II.1.2.a. Découverte des récepteurs opioïdes	25
II.1.2.b. Localisation des récepteurs opioïdes	27
II.1.2.c. Récepteurs opioïdes et propriétés renforçantes des opiacés	29
II.1.3. <i>Les principaux peptides opioïdes endogènes</i>	31
II.2. Bases neurobiologiques de la dépendance et du sevrage des opiacés	32
II.2.1. <i>Neuroadaptations au sein du système opioïde endogène (régulations homologues)</i>	34
II.2.2. <i>Neuroadaptations dans les systèmes non-opioïde (régulations hétérologues) : implication des systèmes monoaminergiques centraux</i>	38
II.2.2.a. Implication du système dopaminergique mésolimbique	38
II.2.2.b. Implication des systèmes noradrénergiques	40
II.2.2.c. Implication des systèmes sérotoninergiques	43
II.2.3. <i>Régulation des voies de transductions intracellulaires</i>	44
II.2.4. <i>Apports des souris déficientes pour des récepteurs impliqués dans la dépendance aux opiacés</i>	47
II.3. Modèles d'étude de la dépendance et du sevrage des opiacés	50
II.3.1. <i>Induction de la dépendance aux opiacés</i>	50
II.3.2. <i>Modèles d'étude du syndrome de sevrage des opiacés</i>	51
II.3.2.a. Symptomatologie du sevrage des opiacés	51
II.3.2.b. Modèles d'étude de la composante motivationnelle du sevrage	52
II.3.2.c. Modèles d'étude de la composante somatique du sevrage	53
III. RENFORCEMENT, MOTIVATION ET ADDICTION	53
III.1. Définitions de l'addiction	53
III.1.1. <i>Définitions officielles d'après le CIM 10 (1992) et le DSM IV (1994)</i>	53
III.1.2. <i>L'addiction : une interaction drogue – individu – environnement</i>	55
III.1.2.a. L'addiction : un désordre lié à une substance ?	55
III.1.2.b. L'individu : importance des facteurs génétiques et de la réponse au stress dans la vulnérabilité aux drogues d'abus	55
III.1.2.c. L'environnement associé à l'abus de drogue	56
III.2. Neuropsychobiologie du renforcement et de la motivation : implications pour les théories de l'addiction	57
III.2.1. <i>Modèles du renforcement positif et du renforcement négatif</i>	57
III.2.2. <i>« The incentive-sensitization theory »</i>	57
III.2.3. <i>« The hedonic homeostatic dysregulation theory »</i>	58
III.2.4. <i>Quel rôle pour la dopamine dans les processus addictifs ?</i>	60
IV. EMOTIONS ET MOTIVATION : IMPLICATION DE L'« EXTENDED AMYGDALA »	63
IV.1. Amygdale et processus émotionnels	63
IV.1.1. <i>Vue d'ensemble</i>	63
IV.1.2. <i>Neuroanatomie de l'amygdale</i>	64

IV.1.3.	<i>Apport des études sur le conditionnement des réponses émotionnelles</i>	64
IV.1.3.a.	Conditionnement aversif	64
IV.1.3.b.	Conditionnement appétitif	65
IV.2.	L'« <i>extended amygdala</i> » : à l'interface des émotions, de la motivation et des processus d'apprentissage associatifs	66
IV.2.1.	<i>Anatomie de l'« extended amygdala »</i>	66
IV.2.2.	<i>Implications fonctionnelles : rôle du BIA, du CeA et de l'Acb dans les processus émotionnels et motivationnels</i>	68
IV.2.2.a.	Rôle du noyau basolatéral de l'amygdale	70
IV.2.2.b.	Rôle du noyau central de l'amygdale	71
IV.2.2.c.	Rôle du noyau accumbens	72
IV.2.2.d.	Conclusions sur les interactions BIA/CeA/Acb dans les processus émotionnels et motivationnels	73
IV.2.3.	<i>Implication des interactions amygdale/accumbens dans l'addiction</i>	74
MATÉRIEL & MÉTHODES		78
I. CHOIX METHODOLOGIQUES		78
II. ANIMAUX ET TRAITEMENTS		79
II.1.	Conditions d'élevage des animaux	79
II.2.	Induction de la dépendance à la morphine et du syndrome de sevrage	80
III. PROTOCOLE DE L'AVERSION DE PLACE CONDITIONNEE (PAC)		80
IV. PROTOCOLES EXPERIMENTAUX ET ORGANISATION DES GROUPES D'ANIMAUX		82
IV.1.	Etude des effets inconditionnés du sevrage (cf. Chapitre 1)	82
IV.2.	Etude des effets conditionnés du sevrage (cf. Chapitre 2)	83
V. HYBRIDATION IN SITU QUANTITATIVE (SONDES ARNc)		86
V.1.	Hybridation <i>in situ</i> en simple marquage	86
V.1.1.	<i>Marquage des sondes ARNc à l'UTP-$\alpha^{35}S$ par transcription in vitro (ARN-^{35}S)</i>	86
V.1.2.	<i>Protocole d'hybridation : simple marquage</i>	87
V.2.	Hybridation <i>in situ</i> en double marquage	88
V.2.1.	<i>Marquage des sondes ARNc à l'UTP-11-digoxygénine par transcription in vitro (ARN-digoxygénine)</i>	88
V.2.2.	<i>Protocole d'hybridation : double marquage</i>	89
V.3.	Quantification par analyse d'image	89
V.3.1.	<i>Analyse par densitométrie sur film rayon X</i>	90
V.3.2.	<i>Analyse microscopique par comptage de neurone</i>	90
V.3.3.	<i>Analyse microscopique par comptage de grains</i>	92
V.4.	Analyses statistiques	92
CHAPITRE 1		94
<i>Substrats neurobiologiques des composantes motivationnelle et somatique du sevrage des opiacés précipité par la naloxone</i>		
I. INTRODUCTION		94
II. RESULTATS		95
II.1.	Analyse globale des données comportementales concernant le sevrage des opiacés	95
II.2.	Cartographie de l'expression de l'ARNm <i>c-fos</i> dans le cerveau après un sevrage précipité par la naloxone chez le rat morphino-dépendant	96
II.3.	Analyse quantitative de l'expression de <i>c-fos</i> après un sevrage précipité par des doses croissantes de naloxone	97
II.3.1.	<i>Aires striatales, septum latéral et structures de l'« extended amygdala ».</i>	97
II.3.2.	<i>Noyaux dopaminergiques et noradrénergiques</i>	98
II.3.3.	<i>Aires corticales et hypothalamiques, hippocampe et substance grise périaqueducatale</i>	99
II.4.	Analyse de l'expression de <i>c-fos</i> dans des neurones identifiés de l'aire tegmentale ventrale et de l'amygdale	99
II.4.1.	<i>Les réponses c-fos dans la VTA concernent principalement les neurones GABAergiques et une faible sous-population de neurones dopaminergiques</i>	99

II.4.2.	<i>Expression de c-fos dans des neurones identifiés des noyaux central et basolatéral de l'amygdale au cours du sevrage des opiacés</i>	100
II.4.2.a.	Une grande majorité de neurones GAD négatifs est inhibée au cours du sevrage précipité par des doses croissantes de naloxone	100
II.4.2.b.	Réponse différentielle entre la partie capsulaire et la partie latérale du CeA au cours du sevrage précipité par des doses croissantes de naloxone	101
III.	DISCUSSION	101
III.1.	Corrélations avec les études comportementales	103
III.2.	Réponses <i>c-fos</i> opposées entre le noyau central et le noyau basolatéral de l'amygdale	105
III.3.	Signification fonctionnelle de l'expression de l'ARNm <i>c-fos</i>	106
III.4.	Mécanismes potentiels pour l'expression de <i>c-fos</i> dans les structures recrutées par le sevrage précipité par des faibles doses de naloxone	107
IV.	CONCLUSIONS	109
CHAPITRE 2		122
<hr/>		
	<i>Substrats neurobiologiques engagés dans le rappel d'événements aversifs associés au sevrage des opiacés (« mémoire du sevrage »)</i>	
I.	PARTIE 1 : DISSOCIATIONS ANATOMIQUES ET FONCTIONNELLES DES EFFETS INCONDITIONNES ET CONDITIONNES DU SEVRAGE DES OPIACÉS	122
I.1.	Introduction	122
I.2.	Résultats : cartographie de l'expression de <i>c-fos</i>	123
I.2.1.	<i>Expression comportementale de l'aversion de place conditionnée induite par la naloxone</i>	123
I.2.2.	<i>Cartographie de l'expression de l'ARNm c-fos après réexposition à des stimuli associés au syndrome de sevrage ou après un sevrage précipité de manière aiguë par la naloxone</i>	124
I.2.3.	<i>Comparaison entre les réponses c-fos conditionnées chez des rats réexposés aux stimuli associés au sevrage, et l'expression de c-fos induite par la naloxone chez des animaux morphino-dépendants</i>	125
I.2.3.a.	Structures de l'« <i>extended amygdala</i> » et structures impliquées dans les processus d'apprentissage associatif	125
I.2.3.b.	Aire tegmentale ventrale	127
I.2.3.c.	Locus coeruleus et noyaux hypothalamiques	128
I.3.	Discussion	128
I.3.1.	<i>Substrats neurobiologiques sous-tendant la « mémoire du sevrage »</i>	129
I.3.2.	<i>Rôle des stimuli proximaux et distaux associés au sevrage des opiacés</i>	130
I.3.3.	<i>Les substrats neuronaux impliqués dans le rappel d'événements aversifs associés au sevrage sont partiellement dissociés de ceux recrutés par le sevrage aigu</i>	131
I.4.	Conclusions	133
II.	PARTIE 2 : IMPLICATION DIFFERENTIELLE DE DIVERSES SOUS-POPULATIONS NEURONALES DANS L'AIRE TEGMENTALE VENTRALE ET L'AMYGDALÉ	134
II.1.	Introduction	134
II.2.	Résultats : caractérisation phénotypique des neurones recrutés	136
II.2.1.	<i>Les réponses c-fos inconditionnées et conditionnées dans la VTA concernent principalement les neurones GABAergiques et une faible sous-population de neurones dopaminergiques</i>	136
II.2.2.	<i>Réponses opposées dans le BIA et le CeA après un sevrage aigu et après réexposition aux stimuli associés au sevrage</i>	137
II.2.2.a.	Une majorité de neurones GAD négatifs est inhibée au cours du sevrage aigu, mais activée après réexposition aux stimuli associés au sevrage	137
II.2.2.b.	Les réponses inconditionnées et conditionnées sont opposées dans les neurones GABAergiques du CeA	138
II.2.3.	<i>Une sous-population de neurones GAD négatifs du BIA est activée chez les rats en sevrage de la morphine</i>	138
II.3.	Discussion	139
II.3.1.	<i>Effet du sevrage aigu et des stimuli conditionnés au sevrage dans des neurones identifiés de la VTA</i>	140
II.3.2.	<i>Implication différentielle des neurones du CeA et du BIA dans la formation et le rappel de la « mémoire du sevrage »</i>	141
II.3.3.	<i>Un modèle fonctionnel pour la formation et le rappel de la « mémoire du sevrage des opiacés »</i>	143
II.4.	Conclusions	144

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES	163
I. CONCLUSIONS	163
II. PERSPECTIVES	167
BIBLIOGRAPHIE	170

INDEX DES FIGURES & TABLEAUX

FIGURES

- Figure 1.** Formule chimique de la morphine et de l'héroïne.
- Figure 2.** Représentation schématique de la distribution des sites de liaison et des ARNm des récepteurs μ , δ et κ dans le système nerveux central (d'après Mansour *et al.*, 1995a).
- Figure 3.** Localisation des récepteurs opioïdes dans le complexe striatal et le mésencéphale.
- Figure 4.** Précurseurs des peptides opioïdes endogènes.
- Figure 5.** Illustration de la séquence des événements conduisant à l'internalisation d'un récepteur (d'après Williams *et al.*, 2001).
- Figure 6.** Effet des opiacés dans l'aire tegmentale ventrale (VTA).
- Figure 7.** Représentation schématique des modifications engendrées par l'exposition aiguë et chronique à la morphine, au sein de la voie de transduction dépendante de l'AMPc dans les neurones du LC ou de l'Acb (d'après Nestler, 2001).
- Figure 8.** Réponses aux drogues et comportements spontanés chez des souris déficientes pour les différents sous-types de récepteurs opioïdes (μ , δ et κ) (d'après Gaveriaux-Ruff & Kieffer, 2002).
- Figure 9.** Illustration des fondements neurobiologiques du passage de l'usage à l'abus de drogue selon la théorie de la dérégulation de l'homéostasie hédonique (d'après Koob & Le Moal, 2001).
- Figure 10.** Processus d'acquisition de la récompense selon le modèle de l'« *incentive-saliency* » (d'après Berridge & Robinson, 1998).
- Figure 11.** Représentation schématique des connexions intrinsèques et extrinsèques de la division centrale de l'« *extended amygdala* », et de son organisation neurochimique.
- Figure 12.** Diagramme schématique représentant l'organisation de type « *shell/core/pallidum* » des différentes sous-divisions du CeA (d'après Cassell *et al.*, 1999).
- Figure 13.** Représentation schématique simplifiée des relations fonctionnelles entre les noyaux de l'amygdale (BIA et CeA) et le noyau accumbens pour le traitement des informations émotionnelles et motivationnelles (d'après Cardinal *et al.*, 2002).
- Figure 14.** Dispositif expérimental utilisé pour le conditionnement des effets aversifs du syndrome de sevrage des opiacés.
- Figure 15.** Etude des effets de la réexposition à des stimuli environnementaux associés au sevrage des opiacés : protocole expérimental et organisation des groupes d'animaux.
- Figure 16.** Niveaux anatomiques et structures cérébrales analysées pour l'expression de l'ARNm *c-fos* (d'après Paxinos & Watson, 1997).
- Figure 17.** Analyse comportementale globale du syndrome de sevrage de la morphine précipité par la naloxone.
- Figure 18.** Effet de doses croissantes de naloxone sur l'aversion de place conditionnée, chez des rats placebos.
- Figure 19.** Cartographie de l'expression de l'ARNm *c-fos* dans l'ensemble du cerveau après un sevrage précipité par des doses croissantes de naloxone.
- Figure 20.** Mesures quantitatives de l'expression de l'ARNm *c-fos* après un sevrage précipité par des doses croissantes de naloxone.
- Figure 21.** Expression de l'ARNm *c-fos* dans l'amygdale après un sevrage précipité par des doses croissantes de naloxone.
- Figure 22.** Expression de l'ARNm *c-fos* induite par la naloxone au niveau du locus coeruleus.
- Figure 23.** Quantification de l'expression de l'ARNm *c-fos* induite par la naloxone dans les aires corticales et hypothalamiques, et dans l'hippocampe et la substance grise périaqueducatale.
- Figure 24.** Mesure quantitative de l'expression de l'ARNm *c-fos* induite par des doses croissantes de naloxone dans des neurones phénotypiquement identifiés de la VTA.

- Figure 25.** Quantification de l'expression de l'ARNm *c-fos* induite par des doses croissantes de naloxone dans des neurones phénotypiquement identifiés du BIA et des différentes sous-divisions du CeA (partie capsulaire et latérale).
- Figure 26.** Mesure de l'aversion de place conditionnée induite par la naloxone chez des rats morphino-dépendants.
- Figure 27.** Quantification dans les structures de l'« *extended amygdala* » (AcbS, BNSTv et CeA) et dans le BIA, comparant les réponses *c-fos* inconditionnées et conditionnées.
- Figure 28.** Illustration des réponses *c-fos* conditionnées dans l'Acb, le BNST, et le locus coeruleus.
- Figure 29.** Comparaisons entre les réponses *c-fos* conditionnées et l'expression de l'ARNm *c-fos* induit par la naloxone dans les noyaux central et basolatéral de l'amygdale.
- Figure 30.** Mesures quantitatives comparant les réponses *c-fos* conditionnées et l'expression de *c-fos* induit par la naloxone dans l'hippocampe.
- Figure 31.** Comparaison de l'expression de l'ARNm *c-fos* dans l'aire tegmentale ventrale après un sevrage précipité par la naloxone, ou après réexposition aux stimuli associés au sevrage.
- Figure 32.** Histogrammes montrant l'expression de l'ARNm *c-fos* dans le locus coeruleus et le PVH induit par la réexposition aux stimuli associés au sevrage des opiacés, ou par un sevrage précipité par 120 µg/kg de naloxone.
- Figure 33.** Quantification de l'expression de l'ARNm *c-fos* dans des neurones phénotypiquement identifiés de la VTA, après un sevrage aigu précipité par la naloxone ou après réexposition aux stimuli environnementaux associés au sevrage.
- Figure 34.** Caractérisation phénotypique des neurones de la VTA qui expriment l'ARNm *c-fos* après un sevrage précipité par la naloxone ou après réexposition aux stimuli environnementaux associés au sevrage.
- Figure 35.** Quantification de l'expression de l'ARNm *c-fos* dans des neurones phénotypiquement identifiés du BIA et du CeA, après un sevrage aigu précipité par la naloxone ou après réexposition aux stimuli environnementaux associés au sevrage.
- Figure 36.** Illustration des patterns de variation de l'expression de *c-fos* opposés détectés dans les neurones phénotypiquement identifiés du BIA et du CeA après un sevrage aigu précipité par la naloxone ou après réexposition aux stimuli environnementaux associés au sevrage.
- Figure 37.** Distributions de fréquence de la densité de grain d'argent par unité de surface cellulaire exprimée dans les neurones *c-fos*+/*GAD*- et *c-fos*+/*GAD*+ du BIA, après un sevrage aigu précipité par 120 µg/kg de naloxone.
- Figure 38.** Modèle fonctionnel pour la formation et le rappel de la « mémoire du sevrage des opiacés ».
- Figure 39.** Vue d'ensemble des résultats : circuits neurobiologiques engagés dans le traitement des informations liées à la composante motivationnelle du sevrage.

TABLEAUX

- Tableau 1.** Classification des récepteurs opioïdes, ligands synthétiques et endogènes, et voies de transduction associées (d'après « *The SIGMA-RBI handbook of receptor classification and signal transduction, 4th Edition* »).
- Tableau 2.** Définitions de l'usage nocif (abus), de la dépendance et du syndrome de sevrage des opiacés selon le DSM IV publié par l'Association Américaine de Psychiatrie (1994) et le CIM 10 publié par l'Organisation Mondiale de la Santé (1992).
- Tableau 3.** Mesure quantitative de l'expression de l'ARNm *c-fos* dans l'ensemble des structures analysées, après un sevrage aigu précipité par la naloxone ou après réexposition aux stimuli associés au sevrage.
- Tableau 4.** Mesure quantitative de la densité globale de neurones *c-fos* positifs dans la VTA et l'amygdale, après un sevrage précipité par la naloxone ou après réexposition aux stimuli associés au sevrage.

ABRÉVIATIONS

6-OHDA, 6-hydroxydopamine.
AC, adénylate cyclase.
Acb, noyau accumbens (striatum ventral).
AcbC, noyau accumbens partie core.
AcbS, noyau accumbens partie médiale shell.
BIA, noyau basolatéral de l'amygdale.
BmA, noyau basomédial de l'amygdale.
BNST, noyau du lit de la strie terminale.
BNSTal, noyau du lit de la strie terminale partie antérolatérale.
BNSTd, noyau du lit de la strie terminale partie dorsale.
BNSTpl, noyau du lit de la strie terminale partie postérolatérale.
BNSTv, noyau du lit de la strie terminale partie ventrale.
CA1, champ CA1 de l'hippocampe.
CA3, champ CA3 de l'hippocampe.
CeA, noyau central de l'amygdale.
CeC, noyau central de l'amygdale partie capsulaire.
CeL, noyau central de l'amygdale partie latérale.
CeM, noyau central de l'amygdale partie médiale.
CgC, cortex cingulaire.
CPu, noyau caudé-putamen (striatum dorsal).
CS, stimulus conditionné.
DAT, transporteur de la dopamine.
DTT, dithiothreitol.
GABA, acide γ -aminobutyrique.
GAD/67, isoforme 67 de l'acide glutamique décarboxylase.
IEGs, « *immediate-early genes* ».
ITC, « *intercalated cell masses* ».
KO, knock-out.
LC, locus cœruleus.
LHA, aire hypothalamique latérale.
LS, septum latéral.
MeA, noyau médian de l'amygdale.
Nal, naloxone.
NGS, sérum normal de chèvre.
NTS, noyau du tractus solitaire.
NTSm, noyau du tractus solitaire médian.
PAC, aversion de place conditionnée.
PAG, substance grise périaqueducatale.
PFA, paraformaldéhyde.
PKA, protéine kinase AMPc dépendante.
PIC, cortex prélimbique.
PVH, noyaux paraventriculaire de l'hypothalamus
SNC, substance noire *pars compacta*.
SNr, substance noire *pars reticulata*.
TH, tyrosine hydroxylase.
THC, Δ 9-tetrahydrocannabinol.
US, stimulus inconditionné.
VTA, aire tegmentale ventrale.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

"I don't feel the sickness yet, but it's in the post, that's for sure. I'm in the junky limbo at the moment, too ill to sleep, too tired to stay awake, but the sickness is on its way. Sweat, chills, nausea, pain and craving. Need like nothing else I have ever known will soon take hold of me. It's on the way."
Mark Renton, in Trainspotting

INTRODUCTION GÉNÉRALE

*C*e que nous pouvons dire au début du XXI^{ème} siècle, en attente de prochains éclairages, est que s'il n'existe pas de société humaine sans drogue, une raison en est, peut-être qu'il n'existe pas de cerveau humain sans drogue. [...] Toutes les pratiques dites addictives, ont la même cible : modifier le fonctionnement psychique humain et sa perception du quotidien que ce soit en freinant ou en accélérant les « drogues » endogènes humaines ou en interférant avec leurs récepteurs, particulièrement dans le circuit hédonique, ou circuit de récompense, pour lequel la voie dopaminergique mésocorticolimbique jouerait un rôle majeur. Ces « drogues » endogènes semblent avoir participé à la sauvegarde de notre espèce, car, par l'intermédiaire du circuit hédonique et de la mémoire du plaisir, elles ont été étroitement liées aux actes essentiels de survie et de pérennisation : manger, échapper aux prédateurs et se reproduire. Le cerveau, comme les autres organes, n'a pas échappé aux règles de l'évolution telles qu'elles ont été énoncées par Darwin [...].

William Lowenstein, 2001

I. CADRE GENERAL ET HYPOTHESES DE TRAVAIL

L'addiction correspond à un état psychopathologique au cours duquel l'obtention, la prise répétée et l'impossibilité de s'abstenir représentent une perte de contrôle sur la prise de drogues (substances psychoactives) ; comportement qui se développe au détriment de nombreuses autres activités, malgré l'apparition de nombreux effets délétères sur la santé et l'équilibre social du sujet. Le développement d'une addiction à une substance psychoactive peut se diviser en trois périodes successives : ① l'acquisition, qui correspond aux premières expositions de l'individu à la drogue, ② une période de maintien ou d'escalade de la consommation, qui peut être ou non entrecoupée par ③ des périodes d'abstinence, aboutissant le plus souvent à une rechute, qui ramène l'individu très rapidement à son niveau d'intoxication initial.

Divers modèles tentent d'expliquer l'ensemble des caractéristiques qui définissent l'addiction. S'il est aisément envisageable que l'acquisition du comportement de prise de drogues dépende surtout de l'état affectif positif produit lors des premières expositions à la drogue, le maintien et l'escalade, ainsi que la rechute, sont la résultante de plusieurs processus à la conjonction desquels émerge une entité psychologique très spécifique des comportements addictifs : le « *craving* »¹, qui serait entre autre à l'origine de la perte de contrôle sur la consommation et qui a également été isolé comme facteur précipitant la rechute. L'identification des processus comportementaux et neurobiologiques participant à l'induction du « *craving* » apparaît comme une étape importante dans la recherche de stratégies thérapeutiques rationnelles et efficaces pour le traitement de la toxicomanie.

Les études cliniques menées chez l'homme ont fait ressortir que le « *craving* » pouvait être induit notamment par la présentation de stimuli environnementaux présents lors de la consommation de la drogue (psychostimulants, opiacés, etc...) et/ou de son sevrage (en particulier pour les opiacés). Ces stimuli environnementaux se verraient alors attribuer des propriétés motivationnelles propres par des

¹ Dans ce manuscrit, le terme anglo-saxon « *craving* » sera employé pour définir le *désir impérieux pour la drogue* que décrivent les toxicomanes.

mécanismes de conditionnement, et pourraient à eux seuls déclencher le désir d'expérimenter à nouveau la drogue. Par ailleurs, les études sur les processus de tolérance, de sensibilisation et de dépendance chez l'animal ont permis de mettre en évidence l'installation de neuroadaptations au sein de certains systèmes de neurotransmetteurs lors de l'exposition répétée d'un organisme à des drogues d'abus, modifiant ainsi la réactivité du sujet de façon quasi permanente aux effets de ces substances. Il est ainsi proposé que la rechute, même après une longue période d'abstinence ne serait alors que l'expression d'une réactivation intense de ces neuroadaptations, notamment par des stimuli préalablement associés avec les effets de la drogue, créant de nouveau un très fort désir pour la substance. Cette thématique de recherche est actuellement en plein développement au sein de la communauté scientifique internationale. Néanmoins, la majorité des travaux publiés jusqu'à présent s'est intéressée aux effets appétitifs des psychostimulants tels que la cocaïne ou l'amphétamine et quasiment aucune donnée n'est disponible concernant les opiacés dans ce domaine. En particulier, les déterminants comportementaux et neurobiologiques des propriétés motivationnelles du sevrage des opiacés et des stimuli conditionnés associés au sevrage dans l'induction du « *craving* » n'ont pour ainsi dire jamais été évalués.

L'hypothèse générale qui sous-tend notre travail est ainsi directement dictée par la recherche clinique qui a suggéré depuis longtemps le rôle prépondérant des stimuli environnementaux associés aux effets aversifs du manque de drogue (stimuli conditionnés) dans la genèse du « *craving* », sans toutefois apporter de données concernant les mécanismes neurobiologiques mis en jeu.

CONCLUSION

Contrairement aux psychostimulants, la dépendance aux opiacés se caractérise par l'apparition d'un syndrome de sevrage lors de l'arrêt de l'administration de la drogue. Dans la symptomatologie du sevrage, il est possible de distinguer une **composante physique** qui s'exprime par l'émergence de diverses manifestations somatiques, et une **composante motivationnelle** qui se traduit par un état de malaise précoce sans signe somatique. La part motivationnelle est bien évidemment fondamentale lorsque l'on s'intéresse à l'effet que peuvent avoir des stimuli environnementaux conditionnés au sevrage sur le comportement de prise de drogue ou sur la rechute. De manière intéressante, ces deux composantes peuvent être modélisées chez l'animal au plan comportemental que ce soit pour les effets du sevrage lui-même (**effets inconditionnés**) ou ceux de stimuli environnementaux qui lui sont associés (**effets conditionnés**).

Afin de mieux caractériser la composante motivationnelle dans le sevrage des opiacés, ainsi que son implication potentielle dans l'induction conditionnée du « *craving* », nous avons voulu tester l'hypothèse selon laquelle **des stimuli environnementaux** associés au **sevrage des opiacés** (stimuli conditionnés) seraient capables de **réactiver des circuits neuronaux recrutés de façon inconditionnée** par le sevrage.

Plus spécifiquement, nos objectifs ont été :

- ① de déterminer, pour les aspects inconditionnés, les **circuits neuronaux** qui sont impliqués dans les **composantes motivationnelle et somatique** du sevrage des opiacés (Chapitre 1).
- ② de déterminer si l'**aspect motivationnel** révélé par le **conditionnement des effets aversifs du sevrage** des opiacés (effets conditionnés) met en jeu les **mêmes substrats neurobiologiques** que ceux impliqués dans le sevrage inconditionné (Chapitre 2).



Pour cela, nous avons utilisé des modèles animaux de dépendance et de sevrage des opiacés : sevrage précipité par la naloxone et aversion de place conditionnée induite par la naloxone chez le rat morphino-dépendant. En utilisant ces modèles comportementaux permettant d'évaluer les propriétés aversives et motivationnelles du syndrome de sevrage, aussi bien sur le versant inconditionné que conditionné, nous avons recherché les substrats neurobiologiques impliqués en « traçant » les circuits neuronaux recrutés, en terme de localisation et de populations neuronales, par une approche de neuroanatomie fonctionnelle.

Nous avons choisi d'analyser et de quantifier l'expression d'un marqueur de réactivité neuronale, l'ARNm du proto-oncogène *c-fos*, par la méthode d'hybridation *in situ*. Cette technique permet d'une part d'étudier de manière extensive les structures cérébrales qui sont impliquées dans ces phénomènes, et d'autre part de pouvoir caractériser phénotypiquement les populations recrutées. Ainsi, notre procédure expérimentale nous permet d'obtenir des données à la fois sur le plan comportemental et sur le plan anatomo-fonctionnel, et ceci chez les mêmes animaux. Notre démarche a été d'analyser les structures et neurones mis en jeu dans les effets inconditionnés motivationnels et somatiques du sevrage des opiacés, et de les comparer systématiquement avec ceux mis en jeu lors de la réexposition à un environnement qui a été précédemment associé avec le sevrage.



II. DEPENDANCE ET SEVRAGE DES OPIACES

II.1. Opiacés et systèmes opioïdes endogènes²

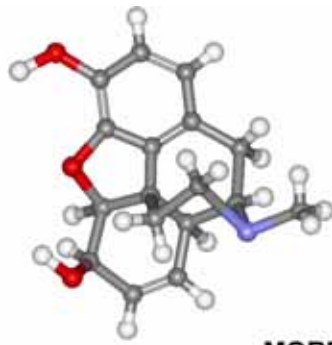
II.1.1. L'opium et ses dérivés, historique

Depuis l'époque sumérienne (4500 – 5000 ans avant notre ère), l'opium – suc extrait des graines du pavot (*Papaver somniferum*) – a été utilisé à des fins médicales pour ses propriétés analgésiques, antidiarrhéiques et antitussives. Cependant, en évoquant l'opium, on pense également aux fumeries chinoises et aux poètes romantiques du XIX^{ème} siècle (Charles Baudelaire, Thomas De Quincey...). C'est à ces auteurs que l'on doit les premiers témoignages écrits sur les effets euphorisants des opiacés, mais également les premières descriptions des phénomènes de tolérance, d'assuétude et de sevrage. En effet, les vertus médicamenteuses de l'opium ont été largement détournées, et ses propriétés euphorisantes sont alors devenues la cause d'un usage abusif important.

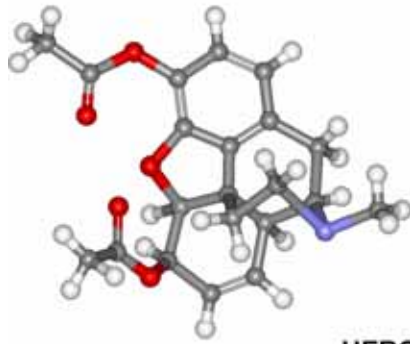
Ce n'est qu'au XIX^{ème} siècle que le chimiste allemand Friedrich Sertüner isola pour la première fois le principal composant actif de l'opium, la morphine alcaloïde. On pensait alors avoir découvert « l'antalgique parfait ». En effet, administrée pour apaiser les douleurs postopératoires ou chroniques, la morphine montrait une efficacité encore non égalée à l'heure actuelle. Cependant, son utilisation prolongée donne lieu à pléthore d'effets secondaires (dépression respiratoire, problèmes gastro-intestinaux, tolérance, dépendance, etc...). Ainsi, en même temps que les recherches s'orientaient sur la compréhension des mécanismes d'action de la morphine, les chimistes et les pharmacologues s'appliquèrent à trouver des molécules dérivées de la morphine possédant ses avantages médicaux, mais ayant un pouvoir addictif moins important.

A la fin du XIX^{ème} siècle, C.R.A. Wright, au « *Saint Mary's hospital* » de Londres, transforme la morphine en héroïne (1874), par le simple ajout de deux groupements acétyles sur la molécule de morphine (Figure 1). La structure de la molécule d'héroïne lui confère une grande capacité lipophile, ce qui favorise le passage de la barrière hémato-encéphalique et la rapidité de ses effets, lors d'une injection intraveineuse. Initialement, l'héroïne – présumée plus efficace que la morphine – avait été proposée par les laboratoires Bayer comme antitussif pour les tuberculeux. Cependant, sa pénétration très rapide dans le système nerveux central, à l'origine du « flash » décrit par les toxicomanes, a largement contribué à son détournement de l'usage médical. L'héroïne n'est dès lors plus utilisée que pour ses propriétés euphorisantes, malgré les nombreux effets délétères que sa consommation abusive implique (dépendance, syndrome de sevrage, etc...). Les dangers que présente son usage n'échappèrent pas longtemps aux médecins, et l'héroïne fut inscrite sur les premières listes de substances toxicomanogènes soumises à contrôle, aussi bien en droit international (1912) qu'en droit français (1916). Depuis les années 1970, l'héroïne est diffusée de façon massive dans les sociétés occidentales, principalement en Europe et aux Etats-Unis, malgré la répression. L'héroïne est

² Dans ce manuscrit, les *récepteurs et les peptides opioïdes* constituent le système *endogène*, alors que toutes les substances *exogènes* qui se lient à ces récepteurs sont appelées les *opiacés*.



MORPHINE



HEROINE

Figure 1. Formule chimique de la morphine et de l'héroïne.

aujourd'hui au centre d'une industrie et d'un commerce illégal mondial, et fait l'objet d'une toxicomanie lourde en terme de santé publique, qui n'épargne presque aucun pays.

II.1.2. Les récepteurs opioïdes

II.1.2.a. Découverte des récepteurs opioïdes

Le groupe des molécules opiacées comprend l'ensemble des alcaloïdes présents naturellement dans l'opium (environ 40 molécules différentes dont la morphine et la codéine), ainsi que leurs dérivés synthétiques (héroïne, méthadone, etc...). D'un point de vue biosynthétique, tous les alcaloïdes de l'opium sont dérivés de la tyrosine. Dans les années 1940, le premier antagoniste spécifique des effets aigus de la morphine, la naloxone, a été purifié après la synthèse de la nalorphine (pour revue : Brownstein, 1993). L'étude systématique des modes d'actions des divers agonistes et antagonistes opiacés a permis d'envisager l'existence de plusieurs types de récepteurs opioïdes au sein du système nerveux central (pour revue : Dhawan *et al.*, 1996).

Au début des années 1970, les avancées de la biologie moléculaire (autoradiographie utilisant des ligands radioactifs) ont permis la découverte de récepteurs spécifiques de la morphine et de ses dérivés (Pert *et al.*, 1973; Simon *et al.*, 1973; Terenius, 1973). Initialement, les récepteurs opioïdes ont été classés en fonction des effets pharmacologiques de différents dérivés opiacés chez l'animal : μ (pour morphine), κ (pour ketocyclazocine) et σ (pour N-allylnormetazocine) (Martin *et al.*, 1976). Les études sur tranches de tissu isolé ont mis en évidence l'interaction des opiacés avec deux types de récepteurs supplémentaires : les récepteurs δ (Lord *et al.*, 1977), et les récepteurs ϵ (Wuster *et al.*, 1979). Au début des années 1990, l'ADNc codant pour le récepteur δ a été cloné pour la première fois (Evans *et al.*, 1992; Kieffer *et al.*, 1992), puis le clonage des récepteurs μ et κ a été entrepris par homologie de séquence (pour revue : Kieffer, 1995).

L'existence d'agonistes et d'antagonistes spécifiques des récepteurs μ , δ et κ , ainsi que leur clonage a permis de les caractériser tant sur le plan pharmacologique que biochimique et structural (Tableau 1) (pour revues : Loh & Smith, 1990; Law & Loh, 1999). Ces récepteurs appartiennent à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires, couplés négativement à l'adenylate cyclase via la protéine de transduction $G\alpha_{i/o}$ et exercent tous un contrôle inhibiteur sur la voie de transduction AMPc dépendante, suite à une stimulation aiguë (pour revue : Minami & Satoh, 1995). En outre, les récepteurs opioïdes sont directement couplés à des canaux ioniques voltage-dépendants par l'intermédiaire de différentes sous-unités des protéines G (Bourinet *et al.*, 1996). Ainsi, leur stimulation influe directement sur l'activité électrique des neurones (pour revue : Williams *et al.*, 2001). En effet, la stimulation aiguë des récepteurs μ et δ permet l'activation d'une conductance potassique, alors que l'activation du récepteur κ est couplée à la réduction d'une conductance calcique voltage-dépendante (North, 1986). Dans les deux cas, la stimulation aiguë des récepteurs opioïdes par un agoniste aboutit à une réduction de l'activité de décharge des neurones, par l'hyperpolarisation de leur potentiel de membrane et la réduction des potentiels d'action calcium-dépendants. A l'inverse, les antagonistes opiacés comme la naloxone lèvent cette inhibition.

Opioid Receptors

CURRENTLY ACCEPTED NAME	μ	δ	κ
CURRENT IUPHAR NAME	OP ₃	OP ₁	OP ₂
SUGGESTED IUPHAR NAME	MOP	DOP	KOP
NAME OF CLONED RECEPTOR	MOR	DOR	KOR
STRUCTURAL INFORMATION	400 aa (human)	372 aa (human)	380 aa (human)
SELECTIVE AGONISTS	DAMGO Fentanyl PL 017 Morphine	DPDPE ^a (-)-TAN-67 ^a [D-Ala ² , Glu ⁴]-Deltorphin ^b DSLET ^b BW373U86 SNC80	U-69593 Enadoline (C1 977) U-50488 Bremazocine ^c EKC ^c
SELECTIVE ANTAGONISTS	β -FNA ^d M-CAM ^d CTAP CTOP Cypriindole	BNTX ^a DALCE ^{a,d} Naltrexon ^b 5'-NTI ^{b,d} TIPP(V) Naltrexone ICI-174,864	non-BNI GNTI
ENDOGENOUS OPIOID PEPTIDES	β -Endorphin Endomorphin-1 and 2 [Met ⁵]-Enkephalin [Leu ⁵]-Enkephalin	β -Endorphin [Leu ⁵]-Enkephalin [Met ⁵]-Enkephalin	Dynorphin A
NON-SELECTIVE OPIOID ANTAGONISTS	β -CNA ^d Naloxone Naltrexone Diprenorphine	β -CNA ^d Naloxone Naltrexone Diprenorphine	β -CNA ^d Naloxone Naltrexone Diprenorphine
SIGNAL TRANSDUCTION MECHANISMS	G _i (cAMP modulation) G ₁₂ (K ⁺ channel open) G ₁₃ (Ca ²⁺ channel closed)	G _i (cAMP modulation) G ₁₂ (K ⁺ channel open) G ₁₃ (Ca ²⁺ channel closed)	G _i (cAMP modulation) G ₁₂ (K ⁺ channel open) G ₁₃ (Ca ²⁺ channel closed)
RADIO-LIGANDS OF CHOICE	[³ H]-DAMGO [³ H]-Naloxone	[³ H]-DSLET ^b [³ H]-[D-Ala ¹]-Deltorphin II ^b [³ H]-Naltrexone [³ H]-DPDPE ^a	[³ H]-U-69593 [³ H]-Bremazocine ^c [³ H]-non-BNI

ABBREVIATIONS
non-BNI: non-Benzazepinone
BNTX: (E)-7-Benzylidenenaltrexone
BW373U86: (S)-1-[5-(2*α*,5*β*)-4-(2,5-Dimethyl-4-(2-propenyl)-1-piperazinyl)-3-hydroxyphenyl]methyl-N,N-dimethylbenzamide
 β -CNA: β -Chloronaltrexamine
CTAP: D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Arg-Tyr-Phe-Thr-NH₂
CTOP: D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Phe-Thr-NH₂
DADLE: [D-Ala², D-Leu⁵]-Enkephalin
DALCE: [D-Ala², Leu⁵, Cys⁶]-Enkephalin
DAMGO: [D-Ala², N-Me-Phe⁴, Gly⁵-ol]-Enkephalin

FOOTNOTES
^a Putative δ_1 ligands.
^b Putative δ_2 ligands.
^c Not selective but used to define "non- κ_1 " sites.

^d These ligands bind irreversibly or pseudoirreversibly

Tableau 1. Classification des récepteurs opioïdes, ligands synthétiques et endogènes, et voies de transduction associées (d'après « *The SIGMA-RBI handbook of receptor classification and signal transduction, 4th Edition* »).

II.1.2.b. Localisation des récepteurs opioïdes

Après la découverte et le clonage des récepteurs μ , δ et κ , divers travaux se sont focalisés sur leur localisation dans le système nerveux central et périphérique. Ces études ont utilisé deux approches complémentaires : ① l'autoradiographie des récepteurs, qui renseigne sur la localisation des sites de liaison pré- ou postsynaptiques des récepteurs opioïdes, et ② l'hybridation *in situ*, qui renseigne sur la localisation de la synthèse des ARNm des récepteurs (pour revue : Mansour *et al.*, 1995a). La relation entre expression de l'ARNm et densité des sites de liaison dans le cerveau du rat pour les récepteurs μ , δ et κ est représentée sur la Figure 2³. Pour certaines structures comme le noyau caudé-putamen (CPu) et le noyau accumbens (Acb), il existe une bonne corrélation entre l'expression de l'ARNm d'un récepteur et la présence de nombreux sites de liaison, ce qui suggère une synthèse et un adressage local du récepteur. A l'inverse, le défaut de corrélation dans d'autres structures, comme par exemple dans la substance noire *pars compacta* (SNc) et l'aire tegmentale ventrale (VTA) pour les récepteurs μ et κ , suggère un transport du récepteur du corps cellulaire vers les terminaisons. Ainsi, les récepteurs κ sont synthétisés dans la SNc et la VTA puis probablement transportés de manière antérograde vers les terminaisons présynaptiques du striatum (CPu et Acb) (Mansour *et al.*, 1994). A l'inverse, la présence de nombreux sites de liaison μ et d'une faible expression de son ARNm dans la SNc, suggère que ces récepteurs pourraient être en partie synthétisés dans le striatum et transportés vers la SNc.

De manière générale, les récepteurs μ , δ et κ sont très largement exprimés dans l'ensemble du système nerveux central, ce qui témoigne de l'implication du système opioïde dans la régulation de nombreuses fonctions physiologiques (en particulier la nociception), sensorielles, émotionnelles et cognitives. Pour le récepteur μ , la répartition des sites de liaison est globalement en accord avec la distribution de l'immunoréactivité du récepteur (Mansour *et al.*, 1995b). Néanmoins, il existe des différences significatives en ce qui concerne la distribution des différents ARNm (sites de synthèse des récepteurs). En effet, les récepteurs μ sont surtout synthétisés dans le thalamus, le CPu, l'Acb, les noyaux médian et cortical de l'amygdale, le locus coeruleus (LC) et le noyau du tractus solitaire (NTS). Les récepteurs δ sont principalement synthétisés dans le cortex, le striatum, l'amygdale

³ Abréviations de la Figure 2 :

ABL, basolateral amygdaloid nucleus; ac, anterior commissure; ACB, nucleus accumbens; ACE, central amygdaloid nucleus; ACO, cortical amygdaloid nucleus; AD, anterodorsal thalamus; AL, anterior lobe, pituitary; AMB, nucleus ambiguus; AME, medial amygdaloid nucleus; AON, anterior olfactory nucleus; ARC, arcuate nucleus, hypothalamus; BST, bed nucleus stria terminalis; cc, corpus callosum; ce, central canal; CL, centrolateral thalamus; CM, centromedial thalamus; CPU, caudate-putamen; CRB, cerebellum; DG, dentate gyrus; DH, dorsal horn, spinal cord; DMH, dorsomedial hypothalamus; DPG, deep grey layer, superior colliculus; DTN, dorsal tegmental nucleus; ENT, entorhinal cortex; EPL, external plexiform layer, olfactory bulb; FCX, frontal cortex; G, nucleus gelatinosus thalamus; GL, glomerular layer, olfactory bulb; GP, globus pallidus; HL, lateral habenula; HM, medial habenula; HPC, hippocampus; IC, inferior colliculus; IGR, intermediate granular layer, olfactory bulb; IL, intermediate lobe, pituitary; ING, intermediate grey layer, superior colliculus; IntP, interposed cerebellar nucleus; IP, interpeduncular nucleus; LC, locus coeruleus; LD, laterodorsal thalamus; LG, lateral geniculate thalamus; LHA, lateral hypothalamic area; LRN, lateral reticular nucleus; LS, lateral septum; MD, dorsomedial thalamus; ME, median eminence; Med, medial cerebellar nucleus; MG, medial geniculate; Mi, mitral cell layer, olfactory bulb; ml, medial lemniscus; MM, medial mammillary nucleus; MS, medial septum; MV, medial vestibular nucleus; NDB, nucleus diagonal band; NL, neural lobe, pituitary; NRG, nucleus reticularis gigantocellularis; NTS, nucleus tractus solitarius; OB, olfactory bulb; ot, optic tract; OTU, olfactory tubercle; PAG, periaqueductal grey; PBN, parabrachial nucleus; pc, posterior commissure; PCX, parietal cortex; PN, pons; PnR, pontine reticular; PO, posterior nucleus thalamus; POA, preoptic area; PrS, presubiculum; PV, paraventricular thalamus; PVN, paraventricular hypothalamus; RD dorsal raphe; RE, reuniens thalamus; RM, raphé magnus; RME, median raphe; SC, superior colliculus; scp, superior cerebellar peduncle; SG, substantia gelatinosa; SNC, substantia nigra, pars compacta; SNR, substantia nigra, pars reticulata; SNT, sensory nucleus trigeminal; SON, supraoptic nucleus; STCX, striate cortex; STN, spinal trigeminal nucleus; SUG, superficial grey layer, superior colliculus; TCX, temporal cortex; TZ, trapezoid nucleus; VH, ventral horn, spinal cord; VL, ventrolateral thalamus; VM, ventromedial thalamus; VMH, ventromedial hypothalamus; VP, ventral pallidus; VPL, ventroposterolateral thalamus; VTA, ventral tegmental area; ZI, zona incerta.

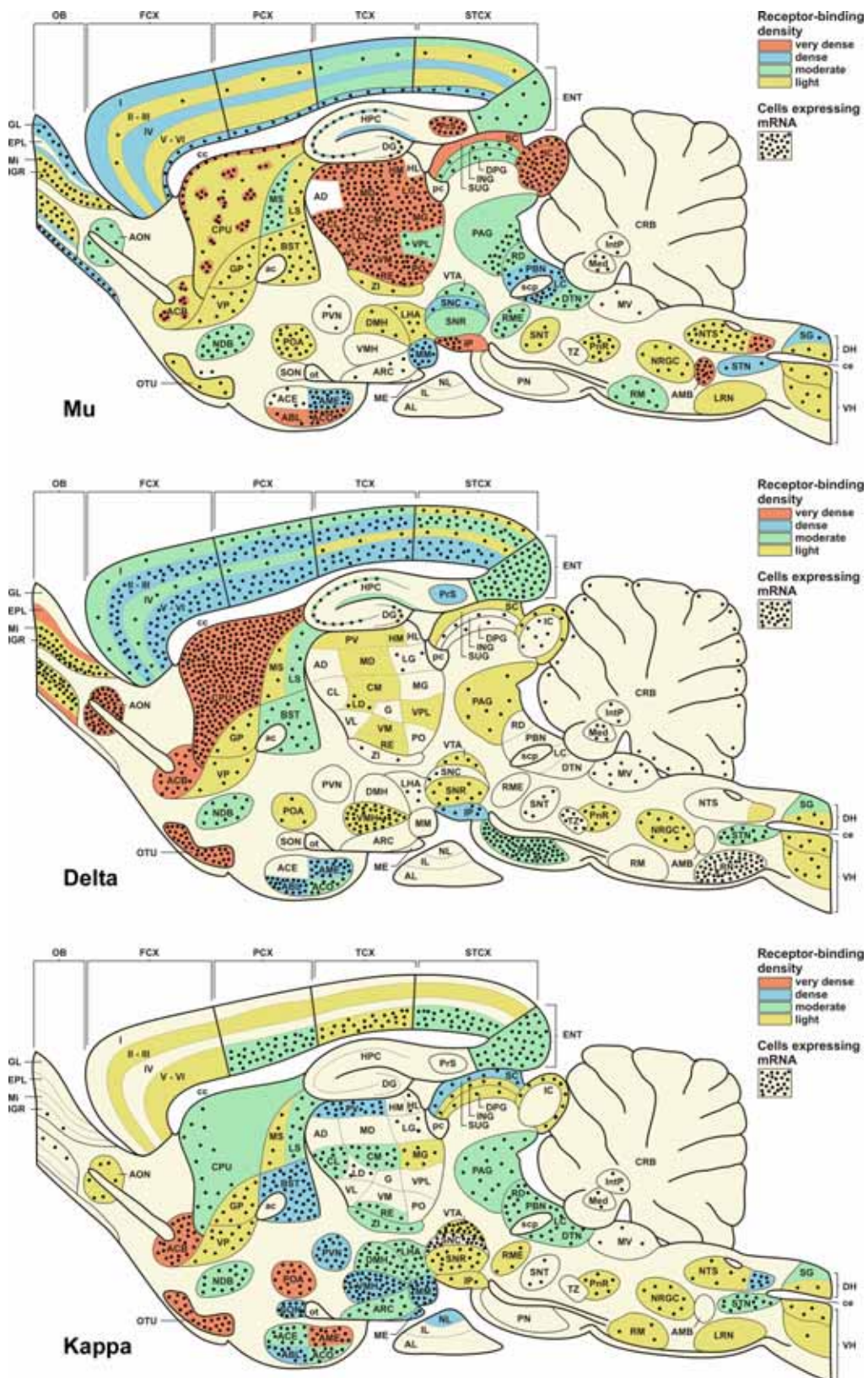


Figure 2. Représentation schématique de la distribution des sites de liaison et des ARNm des récepteurs μ , δ et κ dans le système nerveux central (d'après Mansour *et al.*, 1995).

(excepté le noyau central), et les tubercules olfactifs. L'ARNm du récepteur κ est très présent dans l'Acb, le noyau du lit de la strie terminale (BNST), l'amygdale, l'hypothalamus, la SNc, la VTA, et le NTS médian (NTSm).

La répartition des ARNm des récepteurs μ , δ et κ a été étudiée de manière détaillée dans les différentes populations neuronales du complexe striatal ainsi que dans le mésencéphale ventral (Figure 3). Les récepteurs μ présentent une distribution en îlot (« *patch* ») dans le CPU et l'Acb, alors que l'ARNm des récepteurs κ est distribué de manière plus homogène et présente un gradient de densité augmentant dans l'Acb médial (Mansour *et al.*, 1995b; Georges *et al.*, 1998). D'un point de vue cellulaire, les ARNm codant pour les récepteurs μ et κ sont localisés spécifiquement dans les neurones efférents GABAergiques/Substance P de la voie directe (Georges *et al.*, 1998) projetant directement sur la substance noire *pars reticulata* (SNr) ou la VTA. En revanche, l'ARNm du récepteur δ est plus spécifiquement exprimé dans les interneurons cholinergiques du striatum (Le Moine *et al.*, 1994). Au niveau du mésencéphale ventral, l'ARNm du récepteur κ est présent dans les neurones dopaminergiques de la SNc et de la VTA (Mansour *et al.*, 1994; Georges *et al.*, 1998), mais la protéine des récepteurs κ semble localisée en position présynaptique sur les terminaisons dopaminergiques dans le complexe striatal (Svingos *et al.*, 2001). Les récepteurs μ quant à eux seraient situés sur les terminaisons présynaptiques des neurones striatonigraux de la voie directe dans la SNr, mais également sur les interneurons GABAergiques de la VTA (Georges *et al.*, 1998).

II.1.2.c. Récepteurs opioïdes et propriétés renforçantes des opiacés

De par leur localisation au sein même des systèmes neuromodulateurs dopaminergiques (VTA), noradrénergiques (LC, NTSm) et sérotoninergiques (noyau du raphé dorsal), les récepteurs opioïdes, et en particulier les récepteurs μ et κ , permettent le contrôle de la libération des diverses monoamines centrales (dopamine, noradrénaline et sérotonine) dans les structures cibles (pour revue : Mulder & Schoffelmeer, 1993). Par exemple, l'activation des récepteurs μ dans la VTA est capable de stimuler la transmission dopaminergique dans l'Acb (Di Chiara & Imperato, 1988; Spanagel *et al.*, 1990) et ceci de manière indirecte, en levant l'inhibition médiée par les interneurons GABA de la VTA (pour revues : Di Chiara & North, 1992; Nestler & Aghajanian, 1997). D'autre part, la stimulation des récepteurs κ situés sur les terminaisons des neurones dopaminergiques par des agonistes spécifiques (action présynaptique) diminue la libération de dopamine dans l'Acb (Di Chiara & Imperato, 1988; Spanagel *et al.*, 1990).

De manière intéressante, les trois types de récepteurs opioïdes sont également très présents au niveau de diverses structures limbiques impliquées dans les phénomènes liés à l'addiction (système dopaminergique mésocorticolimbique, Acb, BNST, amygdale, hippocampe), et qui contrôlent de nombreuses fonctions cognitives comme les émotions, la motivation, l'apprentissage et la mémoire. L'activité de ces structures limbiques est aussi modulée par les diverses monoamines centrales, ce qui suggère fortement l'existence d'interactions entre le système opioïde endogène et les systèmes de neuromodulation. D'un point de vue fonctionnel, il a été proposé que les récepteurs opioïdes, au sein de ces réseaux neuronaux, pourraient en partie être impliqués dans les propriétés renforçantes et motivationnelles des opiacés, et ceci de manière différentielle : la stimulation des récepteurs μ et δ

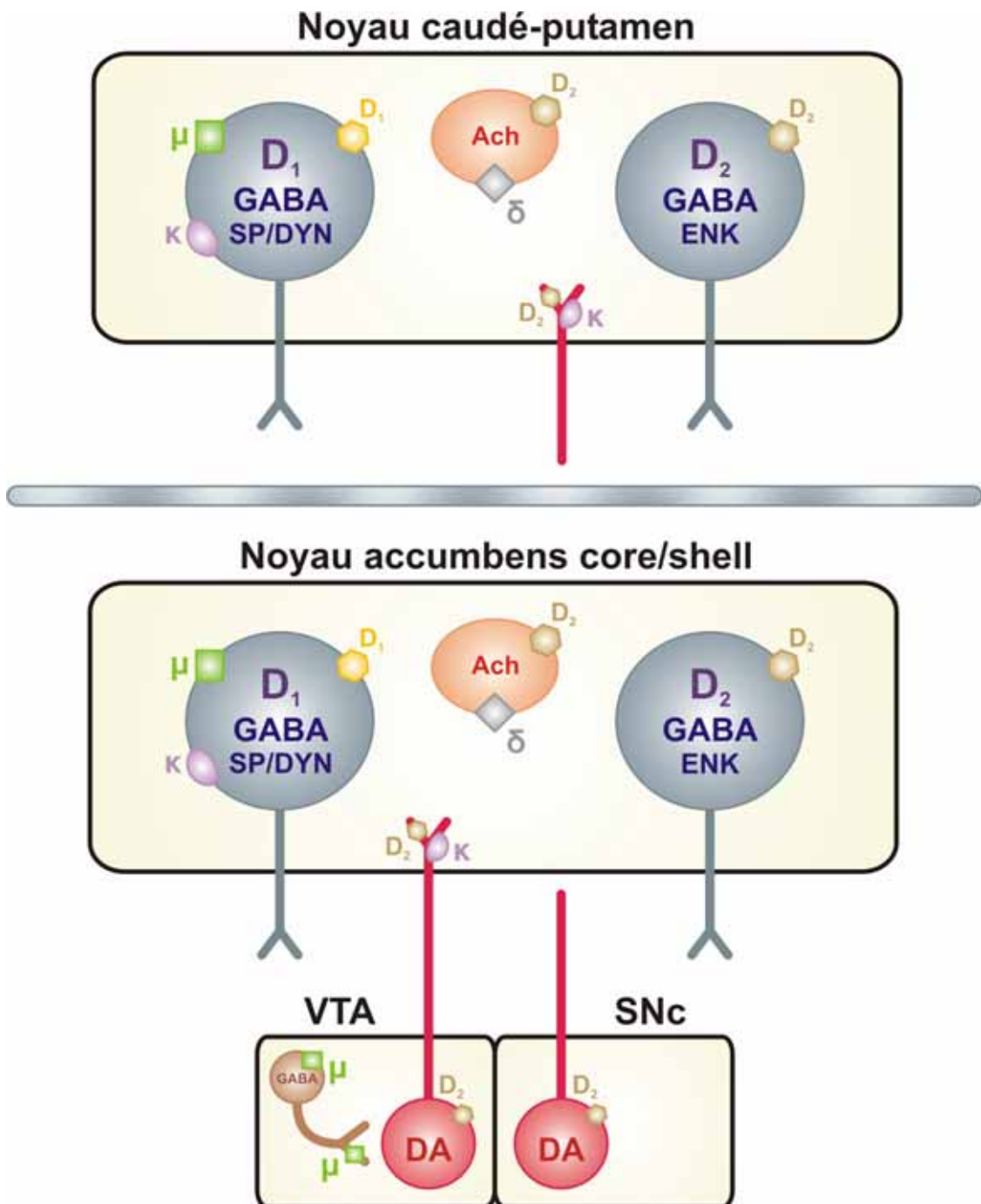


Figure 3. Localisation des récepteurs opioïdes dans le complexe striatal et le mésencéphale.

jouerait un rôle important dans les propriétés appétitives des opiacés (renforcement positif), alors que l'activation des récepteurs κ serait plutôt impliquée dans les effets aversifs du sevrage (renforcement négatif).

En effet, des agonistes spécifiques des récepteurs μ et δ sont capables d'induire une préférence de place conditionnée chez le rat naïf (Shippenberg *et al.*, 1992), ainsi que l'établissement d'un comportement d'autoadministration intracérébral dans la VTA (David & Cazala, 1994; Devine & Wise, 1994). Ainsi, en utilisant l'autoadministration intracérébrale d'opiacés, diverses études ont localisé les effets renforçants de l'activation des récepteurs μ dans de nombreuses structures cérébrales incluant la VTA, l'Acb, le septum latéral (LS), ou encore la substance grise périaqueducatale (PAG). De plus, des injections intracérébrales de morphine dans la VTA, l'Acb ou la PAG déclenchent l'établissement d'une préférence de place conditionnée (Phillips & LePiane, 1980; Van der Kooy *et al.*, 1982; Bals-Kubik *et al.*, 1993). En revanche, les agonistes sélectifs du récepteur κ induisent une aversion de place conditionnée chez le rat naïf (Shippenberg *et al.*, 1993), tout comme l'injection d'antagonistes opiacés (naloxone) chez le rat morphino-dépendant (Mucha, 1987; Hand *et al.*, 1988; Schulteis *et al.*, 1994; Stinus *et al.*, 2000). De plus, les effets appétitifs conditionnés de la morphine (agoniste μ) et les effets aversifs conditionnés des agonistes κ sont complètement abolis par une lésion de l'Acb à la 6-hydroxydopamine (6-OHDA), et reversés par la micro-injection d'un antagoniste dopaminergique de type D_1 (SCH23390) dans l'Acb (Shippenberg *et al.*, 1993).

L'ensemble de ces données montre que les récepteurs opioïdes sont directement impliqués dans les processus de renforcement (Shippenberg & Elmer, 1998; Van Ree *et al.*, 1999), et que les variations des niveaux extracellulaires de dopamine dans l'Acb induites par la stimulation et/ou le blocage des différents récepteurs opioïdes pourraient également sous-tendre les propriétés motivationnelles des substances opiacées (pour revue : Koob & Le Moal, 1997). De manière intéressante, toutes les drogues psychoactives et potentiellement addictives chez l'homme, que ce soit les opiacés (morphine, héroïne), l'alcool, les psychostimulants (cocaïne, amphétamine) ou encore la nicotine, ont pour caractéristique commune d'augmenter les niveaux de dopamine extracellulaire dans l'Acb. Selon le modèle du renforcement positif, l'acquisition du comportement de prise de drogue résulterait de l'état affectif positif produit par la drogue (Wise, 1978; Di Chiara & North, 1992; Koob, 1992; Wise, 1996a). Aussi, ce modèle postule que l'activation de la transmission dopaminergique dans les structures limbiques induite par les drogues d'abus serait à la base de leurs effets renforçants, et parfois même de leurs propriétés addictives.

II.1.3. Les principaux peptides opioïdes endogènes

Suite à la découverte au sein du système nerveux central de récepteurs opioïdes pouvant lier la morphine et ses analogues de synthèse (Pert *et al.*, 1973; Simon *et al.*, 1973; Terenius, 1973), l'existence de ligands endogènes capables d'interagir avec ces récepteurs a rapidement été suggérée. Les ligands endogènes des récepteurs opioïdes ont été découverts dès 1975. Les enképhalines furent les premiers peptides opioïdes endogènes isolés et séquencés (Hughes *et al.*, 1975). Ces facteurs correspondent à deux pentapeptides ayant une structure relativement similaire :

la Met-enképhaline (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met) et la Leu-enképhaline (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu). A ce jour, de nombreux peptides opioïdes endogènes ont été identifiés et dérivent de trois précurseurs qui ont été clonés entre 1979 et 1982 (pour revues : Hollt, 1986; Akil *et al.*, 1998) : la proopiomélanocortine (ou POMC), la proenképhaline A, et la proenképhaline B (ou prodynorphine). Les produits issus des gènes codants pour ces différents précurseurs sont représentés sur la Figure 4.

Les principaux peptides issus de la POMC sont la β -endorphine et les hormones α -MSH et ACTH (impliquée dans la réponse au stress). La proenképhaline A encode le peptide F (qui contient deux motifs Met-enképhaline, un en N-terminal et un en C-terminal), la Leu-enképhaline ainsi que de multiples copies de la Met-enképhaline, incluant deux formes longues : un heptapeptide (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Arg-Phe) et un octapeptide (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Arg-Gly-Leu). La proenképhaline B contient trois séquences de Leu-enképhaline, ainsi que des motifs codant pour des dérivés peptidiques plus longs : les dynorphines A et B.

La β -endorphine, la Met- et la Leu-enképhaline sont des analgésiques puissants qui interagissent préférentiellement avec les récepteurs μ et δ (Tableau 1) (Zajac & Roques, 1983; Tempel & Zukin, 1987). La dynorphine A en revanche possède une très forte affinité pour le récepteur κ (Tableau 1). Au sein du système nerveux central, ces peptides opioïdes sont largement distribués et participent à la régulation de diverses fonctions physiologiques (nociception, immunomodulation, respiration, pression artérielle, etc...) et cognitives (apprentissage et mémoire). Plus particulièrement, au niveau du striatum, l'expression des enképhalines et de la dynorphine est ségréguée dans deux populations de neurones épineux de taille moyenne (GABAergiques). En effet, les enképhalines sont localisées dans les neurones efférents qui correspondent à la voie indirecte projetant sur le pallidum externe, alors que la dynorphine est exprimée dans les neurones de la voie directe qui projettent directement sur la SNr ou la VTA (Gerfen, 1992). Ainsi, ces peptides opioïdes occupent une place privilégiée pour la modulation de l'activité des voies de sortie du striatum et de son contrôle dopaminergique. Après une exposition chronique à la cocaïne ou à l'amphétamine, il a été montré que l'expression de la dynorphine est augmentée dans l'Acb (Cole *et al.*, 1995; Daunais & McGinty, 1995; Spangler *et al.*, 1996; Carlezon *et al.*, 1998). La dynorphine pourrait ainsi contrer les effets appétitifs de la libération de dopamine induits par la drogue (dysphorie) en stimulant les récepteurs κ situés sur les terminaisons des neurones dopaminergiques (Di Chiara & Imperato, 1988; Spanagel *et al.*, 1990).

II.2. Bases neurobiologiques de la dépendance et du sevrage des opiacés

L'étude du développement de la dépendance aux drogues d'abus est multidisciplinaire et s'étend de l'observation du comportement de l'individu aux modifications cellulaires et moléculaires de son système nerveux central. En effet, l'état de dépendance résultant de l'usage répété et abusif de drogue et révélé par le syndrome de sevrage, sous-tend la mise en place de nombreux processus adaptatifs à plus ou moins long terme aboutissant à de nombreux changements intra- et inter-réseaux neuronaux. Ces modifications sont susceptibles de perdurer dans le temps et peuvent ainsi modifier la réactivité de l'individu à long terme. Au niveau comportemental, les neuroadaptations mises en place au cours du traitement chronique à la morphine ne sont pas directement observables chez l'individu

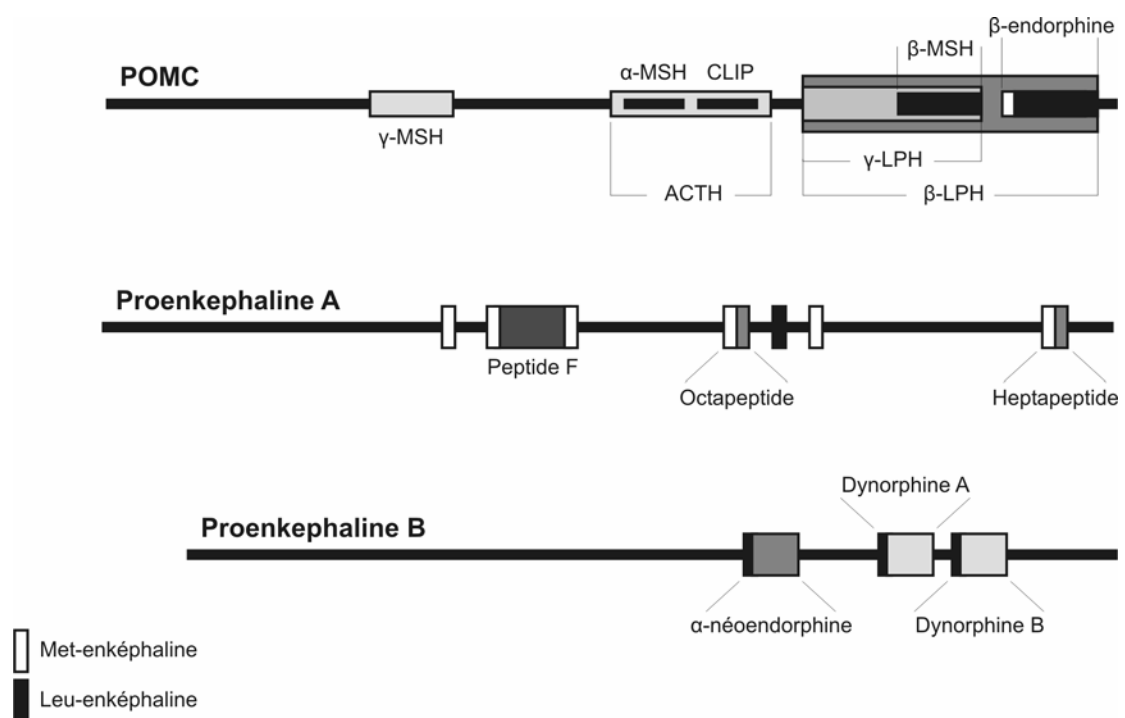


Figure 4. Précurseurs des peptides opioïdes endogènes.

dépendant, puisqu'elles sont masquées par les effets de la drogue. Il est donc nécessaire dans ce cas de déclencher un syndrome de sevrage (par l'arrêt spontané de l'administration de drogue, ou bien par l'injection d'un antagoniste opiacé) afin de démasquer et d'étudier les neuroadaptations qui sous-tendent l'état de dépendance.

Les fondements neurobiologiques des adaptations comportementales, cellulaires et moléculaires qui sont responsables de la dépendance et du sevrage sont très diverses et mettent en jeu des phénomènes de régulation homologues qui affectent le système opioïde endogène, et des régulations hétérologues qui affectent d'autres systèmes de neurotransmetteurs (pour revues : Altman *et al.*, 1996; Nestler & Aghajanian, 1997; Koob & Le Moal, 2001; Nestler, 2001).

II.2.1. Neuroadaptations au sein du système opioïde endogène (régulations homologues)

Le système opioïde endogène est le premier substrat neurobiologique impliqué lors de l'administration chronique d'opiacés, et des mécanismes de régulation homologue se mettent en place à l'intérieur même de ce système pour s'opposer aux effets de la drogue. Aussi, l'administration chronique de morphine provoque des modifications des niveaux de transcription des gènes du système opioïde endogène. En effet, chez le rat morphino-dépendant, une diminution des taux d'ARNm de la préproenképhaline A et de la dynorphine a été observée dans le CPU et l'Acb (Georges *et al.*, 1999). Toutefois, il semble que les traitements chroniques à la morphine soient sans effet sur les taux d'ARNm du récepteur μ dans de nombreuses structures cérébrales (Buzas *et al.*, 1996; Castelli *et al.*, 1997; Georges *et al.*, 1999), ce qui suggère l'existence d'éventuels mécanismes régulateurs plutôt à un niveau post-transcriptionnel pour ces récepteurs. En effet, bien que la biosynthèse de l'ARNm des récepteurs μ ne soit pas affectée par l'administration chronique de morphine, il a été montré que les sites de liaison de ces récepteurs sont augmentés au niveau du striatum et de l'aire tegmentale ventrale (F. Georges, données non publiées), ce qui suggère que les neurones qui expriment ce récepteur pourraient être sensibilisés à l'effet de la morphine dans ces structures.

Lors de l'arrêt de l'imprégnation morphinique, une augmentation de l'expression de l'ARNm du récepteur κ a été mise en évidence dans les neurones dopaminergiques de la VTA après un jour de sevrage (Georges *et al.*, 1999). En accord avec ces données, il a été suggéré que l'activation des récepteurs κ (situés sur les terminaisons présynaptiques des neurones dopaminergiques) par la dynorphine au cours du sevrage pourrait provoquer une diminution de la libération de dopamine (Di Chiara & Imperato, 1988; Devine *et al.*, 1993; Spanagel & Shoaib, 1994). De plus, le système dopaminergique a été largement impliqué dans les effets aversifs des agonistes du récepteur κ (Shippenberg *et al.*, 1992; Shippenberg *et al.*, 1993; Simonin *et al.*, 1998). Ainsi, l'augmentation de l'ARNm du récepteur κ dans les neurones dopaminergiques dès l'arrêt de l'administration chronique de morphine pourrait représenter une adaptation du système opioïde endogène participant à l'inhibition de la transmission dopaminergique au cours du sevrage des opiacés (Pothos *et al.*, 1991; Acquas & Di Chiara, 1992; Rossetti *et al.*, 1992; Diana *et al.*, 1999; Georges & Aston-Jones, 2003); inhibition, qui est généralement associée à la manifestation d'effets aversifs (Mark *et al.*, 1991; Schechter & Meechan, 1994; Besson & Louilot, 1995). Par ailleurs, l'ensemble de ces données

montre l'existence d'interactions directes entre les neuroadaptations dans le système opioïde endogène induite par l'administration chronique et/ou le sevrage des opiacés, et des altérations de l'activité du système dopaminergique mésolimbique.

De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* se sont focalisées sur l'analyse des phénomènes de « *down-regulation* » des récepteurs opioïdes au cours de la dépendance. La « *down-regulation* » fait intervenir de nombreux mécanismes cellulaires et moléculaires ayant pour but la désensibilisation des récepteurs, et pourrait ainsi en partie expliquer le fait que pour une même dose, certains effets des opiacés diminuent au cours d'un traitement chronique (tolérance).

De manière générale, les travaux réalisés *in vitro* dans différentes lignées cellulaires montrent une diminution du nombre de récepteurs opioïdes suite à l'administration chronique de divers agonistes opiacés. Par exemple, des traitements répétés utilisant de l'etorphine (agoniste non sélectif) sur des cellules de type NG108-15 qui n'expriment que les récepteurs opioïdes de type δ de manière endogène, provoque une « *down-regulation* » de ces récepteurs, alors que la morphine (agoniste préférentiel μ) n'a aucun effet (Law *et al.*, 1982). En revanche, l'administration chronique de morphine sur différentes lignées cellulaires n'exprimant que les récepteurs de type μ (cellules 7315c ou Neuro_{2A}) est alors capable d'induire une « *down-regulation* » de ces récepteurs (Puttfarcken *et al.*, 1988; Chakrabarti *et al.*, 1995). Une diminution du nombre maximum de sites de liaison κ (B_{max}) a également été démontrée dans des cellules humaines de type HEK 293 transfectées pour le récepteur κ suite à l'administration chronique de l'agoniste spécifique κ U50.488 (Blake *et al.*, 1997). L'ensemble de ces données obtenues dans des modèles cellulaires *in vitro* suggère fortement que seuls les agonistes spécifiques d'un sous-type de récepteur opioïde seraient efficaces en terme de « *down-regulation* ».

Les données *in vivo* concernant les phénomènes de « *down-regulation* » des récepteurs opioïdes sont beaucoup plus contradictoires (pour revue : Williams *et al.*, 2001). En effet, tous les types de régulation (« *down-regulation* », « *up-regulation* » ou aucune modification du nombre de récepteur) ont été observés suite à l'administration chronique d'agonistes opiacés, et l'efficacité de l'agoniste testé ainsi que la diversité des régions cérébrales analysées semblent être déterminants dans ce type d'étude. Chez le rat, l'analyse de la liaison de ligands ou encore du GTP γ S radioactifs a montré que les traitements chroniques à la morphine provoquent parfois une « *down-regulation* » des récepteurs de type μ , et ceci uniquement dans certaines régions du système nerveux central comme la moelle épinière, le cortex cérébral (Werling *et al.*, 1989; Bhargava & Gulati, 1990), ou encore dans les systèmes noradrénergiques (LC, NTS) et sérotoninergiques (noyau du raphé dorsal) (Sim *et al.*, 1996). Par ailleurs, cette désensibilisation peut s'accompagner d'une augmentation des sites de liaison du récepteur, mais, de manière intéressante, ces phénomènes semblent épargner le complexe striatal (Sim-Selley *et al.*, 2000). D'autres données plus anciennes ont montré au contraire une « *up-regulation* » des récepteurs opioïdes, en particulier ceux engagés dans des complexes μ - δ (Rothman *et al.*, 1986; Rothman *et al.*, 1989). De plus, ces processus ont lieu préférentiellement dans les aires striatales, l'amygdale et l'hypothalamus (Brady *et al.*, 1989). Ces résultats remettent dès lors en question l'implication directe des phénomènes de « *down-regulation* » des récepteurs opioïdes dans la dépendance aux opiacés.

Un autre mécanisme possible pouvant être mis en jeu lors de l'administration chronique d'opiacés et pouvant rendre compte de la dépendance est l'altération de la sensibilité des récepteurs opioïdes. Initialement, la désensibilisation des récepteurs δ a été étudiée *in vitro* dans les cellules NG108-15 (Law *et al.*, 1982), et il a été proposé que ce phénomène mettrait en jeu un découplage physique entre les récepteurs opioïdes et les effecteurs de la voie de signalisation intracellulaire associée, situés directement en aval du récepteur (protéines G) (Figure 5). Ce découplage ferait intervenir une protéine kinase (GRK pour « *G protein-coupled receptor kinase* ») qui viendrait phosphoryler la partie C-terminale du récepteur lorsque celui-ci est stimulé par un agoniste (Pei *et al.*, 1995; Pak *et al.*, 1997), et pourrait représenter la première étape des mécanismes mis en jeu dans la « *down-regulation* » des récepteurs (pour revues : Williams *et al.*, 2001; von Zastrow *et al.*, 2003). En effet, l'ensemble de ces processus de désensibilisation aboutirait à une internalisation des récepteurs dans le compartiment intracellulaire, par l'intermédiaire de mécanismes d'endocytose.

Cependant, les études les plus récentes réalisées dans des modèles cellulaires *in vitro* montrent que, bien que des agonistes spécifiques des récepteurs μ comme le DAMGO, la méthadone ou encore l'etorphine, soient capables de provoquer une internalisation des récepteurs de manière efficace, la morphine en revanche en est incapable (Keith *et al.*, 1998; Whistler *et al.*, 1999; Eisinger *et al.*, 2002). Ces travaux ont également suggéré que certains effets associés à l'utilisation prolongée de morphine (dépendance, tolérance, potentiel addictif, etc...) pourraient être liés à son incapacité à induire des phénomènes d'endocytose et donc, de désensibilisation des récepteurs μ . Par exemple, une étude récente a montré que l'endocytose des récepteurs μ facilitée par le DAMGO peut réduire la tolérance à l'analgésie induite par la morphine (He *et al.*, 2002).

Les travaux réalisés *in vivo* confirment les observations *in vitro*, et montrent bien que la morphine est incapable d'induire l'endocytose des récepteurs μ , et ceci, dans différentes régions du système nerveux central (Sternini *et al.*, 1996; Keith *et al.*, 1998; Trafton *et al.*, 2000; He *et al.*, 2002). Cependant, et de manière intéressante, ces résultats concernent spécifiquement les récepteurs situés sur les corps cellulaires des neurones, et une étude très récente a montré que la morphine est au contraire capable d'induire une internalisation des récepteurs μ , mais uniquement dans les dendrites de neurones de l'Acb (Haberstock-Debic *et al.*, 2003), ce qui suggère que la morphine pourrait induire des effets différents sur le trafic de récepteurs opioïdes présents sur le même neurone, mais dans différents compartiments cellulaires.

Etant donné que les mécanismes de l'internalisation interviennent dans la désensibilisation des récepteurs, l'incapacité de la morphine à provoquer de tels phénomènes dans les corps cellulaires des neurones pourrait résulter à long terme en une activation chronique des cascades de transduction en aval des récepteurs (Finn & Whistler, 2001). En effet, la stimulation aiguë des récepteurs opioïdes par un agoniste inhibe l'activité de l'adénylate cyclase via les protéines $G_{i/o}$ et donc, inhibe la synthèse d'AMPc intracellulaire (pour revue : Minami & Satoh, 1995). Néanmoins, la conséquence majeure de la stimulation chronique des récepteurs opioïdes par la morphine est l'augmentation progressive de l'activité de l'ensemble de la voie de transduction dépendante de l'AMPc qui leur est associée. Ces adaptations intracellulaires ont été décrites au niveau du CPU, de l'Acb, du LC et de la PAG (pour revues : Nestler, 1997, 2001) et seront développés par la suite (cf. § II.2.3., ci-dessous).

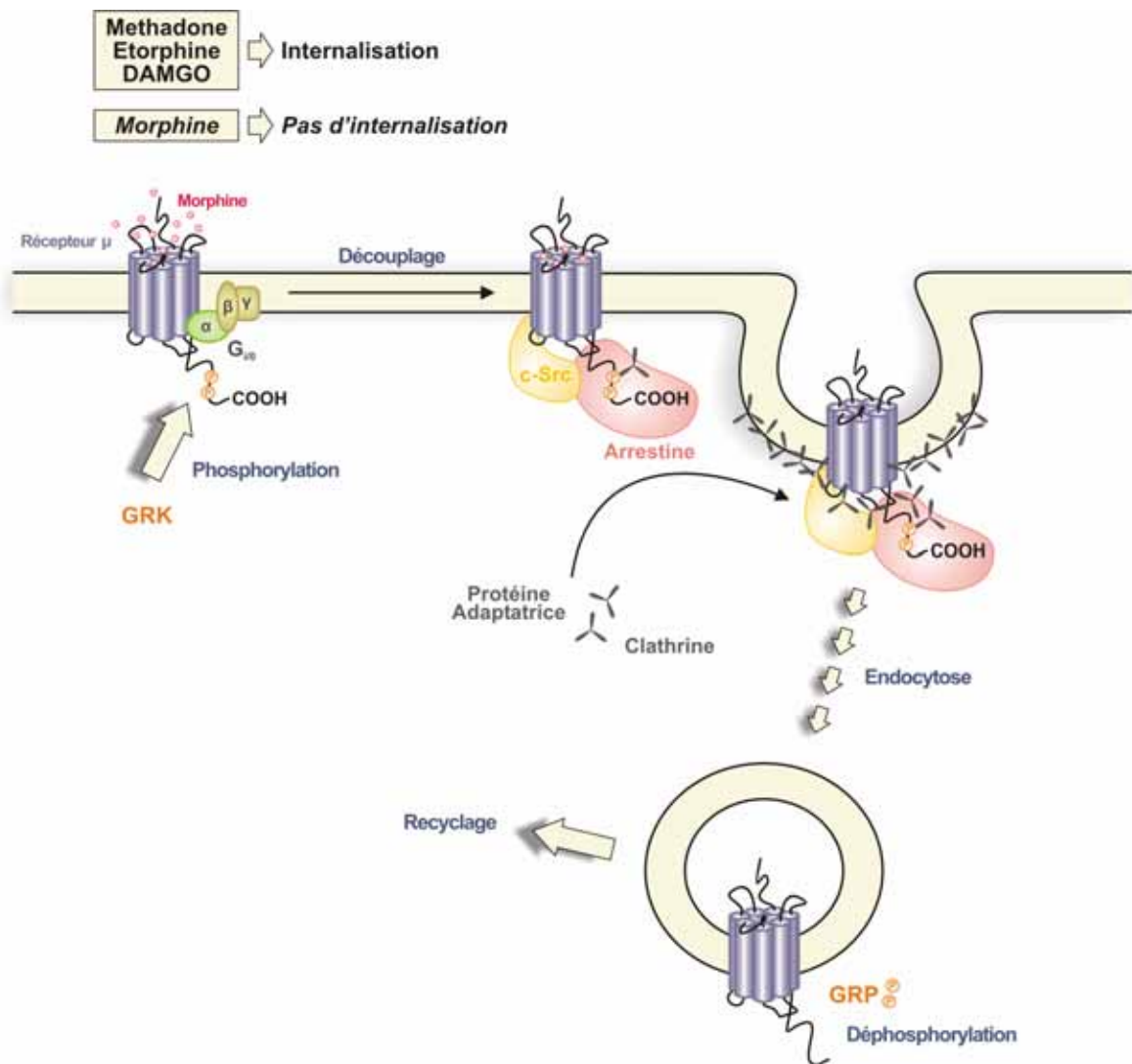


Figure 5. Illustration de la séquence des événements conduisant à l'internalisation d'un récepteur (d'après Williams *et al.*, 2001).

Certains agonistes des récepteurs opioïdes, tels que la méthadone, le DAMGO, ou encore l'etorphine, peuvent activer cette cascade d'évènements (endocytose des récepteurs). En revanche, la morphine n'induit pas de phénomènes d'endocytose des récepteurs. Le récepteur opioïde activé est phosphorylé par une protéine kinase nommée GRK (pour « *G protein-coupled receptor kinase* »). L'affinité de l'interaction entre ce complexe et la protéine arrestine est augmentée, ce qui permet le recrutement d'autres protéines dites adaptatrices (c-Src, etc...), qui permettent à leur tour la liaison de l'arrestine à la clathrine pour provoquer l'endocytose du récepteur.

Malgré l'importance de toutes ces données, les régulations homologues ne peuvent rendre compte à elles seules de l'état de dépendance. En effet, même si l'administration répétée d'opiacés semble provoquer, dans certains cas seulement, une diminution de la réponse aux effets de ces molécules (tolérance), l'animal morphino-dépendant est tout de même hypersensible aux effets de la naloxone, indiquant que les récepteurs opioïdes sont toujours fonctionnels *in vivo* malgré l'exposition chronique à la morphine. Ceci suggère que l'état de dépendance met également en jeu la régulation de nombreux autres systèmes de neurotransmetteurs (régulations hétérologues).

II.2.2. Neuroadaptations dans les systèmes non-opioïde (régulations hétérologues) : implication des systèmes monoaminergiques centraux

Dans la recherche des substrats neuroanatomiques impliqués dans la dépendance, des approches de lésion, d'injection intracérébrale d'antagonistes opiacés ou encore d'anatomie fonctionnelle pour des marqueurs d'activité neuronale ont permis de proposer divers candidats (pour revues : Koob *et al.*, 1992; Harlan & Garcia, 1998). Globalement, ces études ont montré que la dépendance et le sevrage des opiacés impliquent de nombreuses structures cérébrales, qui en général reçoivent des afférences neuromodulatrices provenant d'au moins un des systèmes monoaminergiques centraux. Ces travaux ont également souligné le fait que les propriétés motivationnelles et somatiques du sevrage pourraient être dissociées au sein du système nerveux central et médiées par des substrats neurobiologiques différents (Bozarth & Wise, 1984; Hand *et al.*, 1988; Stinus *et al.*, 1990; Maldonado *et al.*, 1992; Heinrichs *et al.*, 1995; Delfs *et al.*, 2000).

II.2.2.a. Implication du système dopaminergique mésolimbique

Les neurones dopaminergiques dont les corps cellulaires sont situés dans la VTA innervent l'Acb et le cortex préfrontal (pour revues : Björklund & Lindvall, 1984, 1986), mais également les différents noyaux de l'amygdale (Freedman & Cassell, 1994; Brinley-Reed & McDonald, 1999). Cette voie de projection constitue le système dopaminergique mésocorticolimbique (Fallon *et al.*, 1978; Fallon & Moore, 1978). Le système dopaminergique issu de la VTA est le site d'action essentiel et commun à toutes les drogues d'abus (Koob & Le Moal, 1997), et notamment de la morphine et de l'héroïne (Di Chiara & North, 1992). Les mesures *in vivo* de la libération de dopamine indiquent que l'administration aiguë de morphine augmente les niveaux de dopamine extracellulaires dans le noyau accumbens (Di Chiara & Imperato, 1988; Spanagel *et al.*, 1990; Pothos *et al.*, 1991). Il a été proposé que l'activation des neurones dopaminergiques de la VTA par la morphine s'effectuerait via une levée de l'inhibition médiée par les interneurons GABAergiques sur lesquels se trouvent les récepteurs μ (Figure 6) (pour revue : Di Chiara & North, 1992).

De très nombreux travaux se sont focalisés sur l'analyse des mécanismes impliqués dans les propriétés renforçantes des substances opiacées (pour revues : Bardo, 1998; Bechara *et al.*, 1998; Shippenberg & Elmer, 1998; Van Ree *et al.*, 1999), et suggèrent qu'il existe une balance entre le système dopaminergique mésolimbique et le système opioïde endogène, pour le contrôle de la récompense induite par les substances opiacées. Il apparaît clairement que les propriétés

renforçantes immédiates, mises en place lors de l'autoadministration de substances opiacées, sont indépendantes de la libération de dopamine induite par la drogue dans l'Acb (Gerrits *et al.*, 1994; Gerrits & Van Ree, 1996), mais impliquent entre autre une action directe des opiacés au niveau de l'Acb (Vaccarino *et al.*, 1985; Corrigall & Vaccarino, 1988). En revanche, les effets appétitifs conditionnés des opiacés, révélés par exemple dans le modèle de préférence de place, paraissent complètement dépendants de l'intégrité du système dopaminergique mésolimbique (Kelsey *et al.*, 1989; Shippenberg *et al.*, 1993).

L'ensemble de ces résultats semble indiquer qu'il existe deux composantes distinctes dans le phénomène de récompense : ① la première, qui sous-tend les effets appétitifs primaires engendrés par l'injection aiguë d'opiacés (impact hédonique), serait indépendante de l'augmentation de l'activité des neurones dopaminergiques induite par la drogue, alors que ② la deuxième, qui sous-tend les effets renforçants acquis par des stimuli conditionnés associés aux effets primaires des opiacés (aussi dénommés « renforçateurs secondaires »), dépendrait de l'intégrité du système dopaminergique mésolimbique. Le rôle de la dopamine dans les processus motivationnels et addictifs sera discuté par la suite (cf. § III.2., ci-dessous).

L'administration chronique de morphine provoque de nombreuses altérations au niveau cellulaire et moléculaire au sein des neurones dopaminergiques de la VTA (pour revue : Nestler *et al.*, 1993). Par exemple, l'expression de la tyrosine hydroxylase est augmentée dans la VTA (Beitner-Johnson & Nestler, 1991) et la morphologie des neurones dopaminergiques est modifiée : leur taille diminue (Sklair-Tavron *et al.*, 1996) ainsi que le niveau d'expression de différents neurofilaments, ce qui provoque une altération du transport axonal (Beitner-Johnson & Nestler, 1993). Au niveau du striatum (Acb et CPU), les niveaux d'expression des ARNm du récepteur de type D₂ sont diminués dans les neurones efférents de la voie indirecte, après un traitement chronique de six jours à la morphine, alors que l'expression de l'ARNm du récepteur de type D₁ n'est pas modifié dans les neurones de la voie directe (Georges *et al.*, 1999), mais que son affinité semble augmentée (F. Georges, données non publiées). De plus, toute la voie de signalisation intracellulaire dépendante de l'AMPc « s'emballa » dans les neurones de l'Acb (Terwilliger *et al.*, 1991), conduisant à une augmentation de l'activité de l'adénylate cyclase (AC) et de la protéine kinase AMPc dépendante (PKA). Ces processus neuroadaptatifs pourraient en partie expliquer les phénomènes de tolérance à certains effets de la drogue (cf. § II.2.3., ci-dessous).

Des études de microdialyse ont également montré que l'administration chronique de morphine augmente la libération de dopamine dans l'Acb (Johnson & Glick, 1993; Schrater *et al.*, 1993). De plus, une injection aiguë de morphine chez des rats prétraités de façon chronique par des opiacés provoque une libération de dopamine supérieure à celle obtenue chez des rats naïfs (Johnson & Glick, 1993). Ainsi, les neuroadaptations qui émergent au cours de la dépendance à la morphine pourraient également permettre la mise en place d'un phénomène de sensibilisation du système dopaminergique mésolimbique, puisqu'une injection challenge d'opiacé chez un animal morphino-dépendant est non seulement toujours capable de provoquer une augmentation de la libération de dopamine dans l'Acb, mais en plus la potentialise (pour revue : Kalivas & Stewart, 1991).

Les neuroadaptations dans le système dopaminergique ont également été étudiées après l'arrêt de l'imprégnation morphinique. D'une part, il a été montré que les niveaux d'expression des ARNm des récepteurs de type D₁ et D₂ sont diminués le premier jour d'abstinence dans le striatum (Georges *et al.*, 1999). D'autre part, lorsque le syndrome de sevrage est précipité par un antagoniste des récepteurs opioïdes (naloxone ou naltrexone) chez le rat morphino-dépendant, l'activité électrique des neurones dopaminergiques de la VTA est diminuée (Diana *et al.*, 1995; Georges & Aston-Jones, 2003), ainsi que la libération de dopamine dans l'Acb (Acquas *et al.*, 1991; Pothos *et al.*, 1991; Acquas & Di Chiara, 1992; Rossetti *et al.*, 1992).

Des études électrophysiologiques et neuroanatomiques ont proposé que l'inhibition du système dopaminergique mésolimbique au cours du sevrage précipité pourrait résulter d'une désinhibition des interneurons GABAergiques de la VTA (Figure 6) (Bonci & Williams, 1997; Shaw-Lutchman *et al.*, 2002). Des études comportementales ont en plus suggéré que les variations de l'activité du système dopaminergique au cours du sevrage seraient impliquées de façon préférentielle dans la composante motivationnelle du sevrage des opiacés (aspect aversif) (Crippens & Robinson, 1994; Diana *et al.*, 1999). En particulier, Acquas & Di Chiara (1992) ont montré que les concentrations de dopamine extracellulaires dans l'Acb restent diminuées pendant au moins sept jours chez des animaux en sevrage de la morphine, et que la réponse du système dopaminergique mésolimbique ainsi que la réponse comportementale est sensibilisée chez ces animaux en sevrage lors d'une injection challenge de morphine, ce qui suggère que le sevrage pourrait en fait augmenter la sensibilité à la morphine, et ainsi créer les conditions favorables au développement de l'addiction. Cependant, les récepteurs dopaminergiques de type D₂ de l'Acb ont été également impliqués de façon directe dans le contrôle de l'apparition de certains symptômes somatiques du sevrage (Harris & Aston-Jones, 1994; Druhan *et al.*, 2000; Walters *et al.*, 2000), ce qui suggère que la diminution de l'activité dopaminergique au sein de l'Acb au cours du sevrage pourrait également contribuer à la composante somatique du sevrage.

De manière intéressante, il a été montré chez le rat que les niveaux de dopamine extracellulaires sont au contraire augmentés dans le cortex préfrontal au cours du sevrage précipité par la naloxone (Bassareo *et al.*, 1995), indiquant que des sous-populations de neurones dopaminergiques, projetant dans différentes structures cérébrales, pourraient réagir de façon opposée en réponse au sevrage. Cependant, une explication alternative a récemment été proposée, à savoir que la dopamine mesurée dans le cortex préfrontal pourrait ne pas provenir d'afférences dopaminergiques de la VTA, mais plutôt d'afférences noradrénergiques (Devoto *et al.*, 2002).

II.2.2.b. Implication des systèmes noradrénergiques

Le locus coeruleus (aussi dénommé A6) est le plus gros noyau noradrénergique du système nerveux central. Les projections ascendantes du LC ont pour cible différentes régions corticales, l'hippocampe, l'amygdale, le septum, et le thalamus (pour revue : Björklund *et al.*, 1984). En revanche, le BNST et l'hypothalamus ne reçoivent quasiment pas de fibres noradrénergiques provenant du LC, et sont majoritairement innervés par A1 (noyau réticulé paragigantocellulaire, partie latérale) et A2 (NTSm), qui correspondent à des noyaux noradrénergiques plus médullaires.

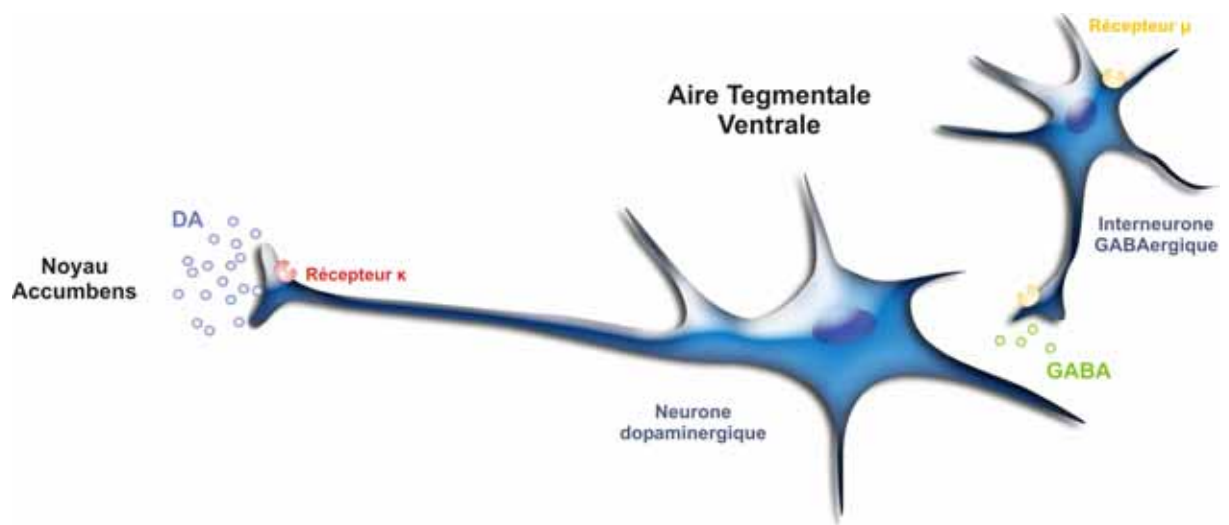


Figure 6. Effet des opiacés dans l'aire tegmentale ventrale (VTA).

Lors d'un traitement aigu, les opiacés augmentent la libération de dopamine dans le noyau accumbens par l'activation des neurones dopaminergiques de la VTA. Cette activation s'effectue de manière indirecte via une inhibition par les opiacés des interneurons GABAergiques. A l'inverse, dès l'arrêt du traitement par les opiacés, le tonus GABAergique est restauré et provoque ainsi une inhibition des neurones dopaminergiques.

L'administration aiguë de morphine provoque une diminution de la libération de noradrénaline dans le cortex préfrontal, le thalamus, l'amygdale, l'hippocampe et le LC (Brodie *et al.*, 1980; Werling *et al.*, 1987; Rossetti *et al.*, 1993; Javelle *et al.*, 1997). Le traitement chronique à la morphine induit très rapidement une tolérance de ces effets, et les niveaux de noradrénaline retournent à un niveau contrôlé. Ce phénomène s'explique par la mise en place d'adaptations cellulaires et moléculaires au sein des neurones du LC permettant de s'opposer aux effets aigus de la morphine (cf. § II.2.3., ci-dessous) (pour revue : Nestler *et al.*, 1993). En revanche, le déclenchement du sevrage de la morphine provoque une augmentation très intense de la libération de noradrénaline dans diverses structures cérébrales incluant le LC, l'hippocampe, et le cortex préfrontal, (Done *et al.*, 1992; Rossetti *et al.*, 1993; Grasing *et al.*, 1997; Javelle *et al.*, 1997). En accord avec ces résultats, le syndrome de sevrage des opiacés induit une augmentation de l'activité électrique des neurones noradrénergiques du LC (Rasmussen *et al.*, 1990). Ce rebond de l'activité du système noradrénergique « matérialise » les neuroadaptations mises en place au cours de la dépendance.

L'utilisation d'agents sélectifs des différents types de récepteurs noradrénergiques a montré que la clonidine, un agoniste des récepteurs α_2 -adrénergiques, a la capacité de diminuer les symptômes du sevrage des opiacés chez l'homme (Gold *et al.*, 1978a, b; Gold *et al.*, 1980), et de bloquer les modifications biochimiques, électrophysiologiques et comportementales exprimées chez le rat morphino-dépendant au cours du sevrage (Aghajanian, 1978; Buccafusco *et al.*, 1984; Malin *et al.*, 1986; Taylor *et al.*, 1988; Kimes *et al.*, 1990; Rasmussen *et al.*, 1995). La clonidine inhibe l'activité électrique des neurones noradrénergiques en activant les autorécepteurs α_2 -adrénergiques de façon présynaptique (Aghajanian, 1978). Cependant, la lésion totale du LC ne modifie pas la symptomatologie du sevrage et n'affecte en rien les effets protecteurs de la clonidine sur le sevrage (Caillé *et al.*, 1999), ce qui remet en question le rôle critique attribué à cette structure au cours du syndrome de sevrage (Maldonado, 1997). En effet, l'embrasement noradrénergique mis en évidence au cours du sevrage pourrait provenir d'autres régions cérébrales, et notamment des noyaux A1 et A2 projetant sur le BNST (Aston-Jones *et al.*, 1997; Aston-Jones *et al.*, 1999a).

Par ailleurs, les variations de l'activité du système noradrénergique issu des noyaux A1 et A2 qui projettent vers le BNST au cours du sevrage des opiacés semblent plutôt impliquées dans la composante motivationnelle du sevrage, et non pas dans la composante somatique (Delfs *et al.*, 2000). En accord avec cette hypothèse, la stimulation du BNST est capable d'augmenter l'activité électrique des neurones dopaminergiques de la VTA (Georges & Aston-Jones, 2001, 2002), et l'administration de clonidine reverse les effets du sevrage précipité par la naltrexone chez un rat morphino-dépendant en augmentant de façon prolongée l'activité des neurones dopaminergiques de la VTA (Georges & Aston-Jones, 2003).

L'ensemble de ces données met en évidence l'existence d'interactions spécifiques entre le système noradrénergique et le système dopaminergique au cours de la dépendance et du sevrage. Néanmoins, le rôle précis de la clonidine sur la composante motivationnelle du sevrage reste encore à définir. En effet, dans le modèle d'aversion de place conditionnée, l'administration de clonidine est capable de bloquer l'acquisition du comportement (lorsqu'elle est injectée au cours des sessions répétées de conditionnement), alors qu'elle n'a aucun effet sur l'expression du comportement car elle

ne bloque absolument pas l'aversion de place conditionnée, si elle est administrée juste avant le test comportemental (Schulteis *et al.*, 1998). Ces résultats indiquent d'une part, que l'effet protecteur de la clonidine lors de l'acquisition du comportement pourrait résulter soit de sa capacité à diminuer la symptomatologie du syndrome de sevrage, soit d'une altération des processus d'apprentissage permettant le transfert de l'état affectif aversif à des stimuli environnementaux. D'autre part, le fait que la clonidine ne soit plus efficace lors du rappel de l'association induit par l'exposition au stimulus conditionné suggère que ce composé aurait une efficacité limitée pour la prévention des phénomènes de rechute induits par des stimuli conditionnés après abstinence.

II.2.2.c. Implication des systèmes sérotoninergiques

Les neurones sérotoninergiques des noyaux du raphé dorsal et médian sont les principales sources de sérotonine du système nerveux central. Ils ont pour cible commune l'hippocampe, le LC et le cortex enthorinal. Les voies de projection propres au noyau du raphé dorsal innervent le CPU, la substance noire, l'amygdale et diverses régions corticales (pour revue : Björklund *et al.*, 1984). Les données concernant les modifications de la transmission sérotoninergiques chez l'animal morphino-dépendant sont peu nombreuses. Des mesures de microdialyse *in vivo* ont montré que l'administration aiguë de morphine augmente la libération de sérotonine dans le noyau du raphé dorsal ainsi que dans les structures de projection des noyaux du raphé dorsal et médian : Acb, CPU, amygdale, hippocampe, cortex frontal, thalamus et hypothalamus (Tao & Auerbach, 1994, 1995). Après un traitement chronique à la morphine, la transmission sérotoninergique retourne à un niveau basal (Tao *et al.*, 1998). Ce phénomène pourrait résulter d'une augmentation progressive de l'activité de la voie de signalisation AMPc dépendante dans les interneurons GABAergiques du raphé dorsal, ayant pour conséquence d'augmenter leur activité (Jolas & Aghajanian, 1997; Jolas *et al.*, 2000). En revanche, le syndrome de sevrage précipité par la naloxone provoque une augmentation de la libération de sérotonine dans le LC (Javelle *et al.*, 1997) et une diminution dans le noyau du raphé dorsal (Tao *et al.*, 1998).

Bien que l'intégrité du système sérotoninergique ne semble pas indispensable à l'expression des composantes motivationnelles et somatiques du sevrage (Caillé *et al.*, 2002), il semble intéressant de noter que ce système participe à la réponse aversive associée au sevrage des opiacés et qu'il fonctionne également en étroite collaboration avec le système noradrénergique. En effet, la lésion du système sérotoninergique n'a aucun effet sur l'aversion de place conditionnée induite par des faibles doses de naloxone, mais en revanche bloque la réponse conditionnée induite par de fortes doses de naloxone (Caillé *et al.*, 2002). En ce qui concerne la symptomatologie physique, la lésion du système sérotoninergique n'a aucun effet, mis à part pour les sauts (« *jumping* ») qui sont complètement absents. De plus, la lésion du système sérotoninergique ou son inhibition pharmacologique aiguë potentialise l'effet protecteur de la clonidine sur le comportement de l'aversion de place conditionnée induit par la naloxone (Caillé *et al.*, 2003).

II.2.3. Régulation des voies de transductions intracellulaires

Les mécanismes d'adaptation mis en jeu au cours de la dépendance, qu'ils soient homologues ou hétérologues, s'accompagnent de modifications dans les systèmes de signalisation intracellulaire, notamment au niveau des seconds messagers (AMPc, calcium). Ces neuroadaptations permettent l'activation de diverses protéines kinases (PKA, PKC, CaMK) qui affectent à leur tour l'activité de nombreuses protéines par phosphorylation, parmi lesquelles se distinguent certains facteurs de transcriptions constitutifs comme CREB (« *cAMP response element binding protein* ») ou inductibles comme le facteur Δ FosB. Ces modifications adaptatives sont représentées sur la Figure 7.

Nous avons rappelé précédemment que les récepteurs opioïdes sont couplés négativement à l'adénylate cyclase (AC) et qu'ils exercent un contrôle inhibiteur sur la voie de signalisation AMPc dépendante (pour revues : Nestler *et al.*, 1993; Minami & Satoh, 1995; Nestler, 1996, 1997). La stimulation aiguë des récepteurs μ (Figure 7A) entraîne une inhibition de l'AC via l'activation de la protéine $G_{i/o}$, ce qui a pour principale conséquence de réduire la synthèse de l'AMPc. En revanche, la stimulation chronique des récepteurs μ (Figure 7B) entraîne une hyperactivité de toute la voie de biosynthèse dépendante de l'AMPc, qui se traduit par une augmentation de l'activité de l'AC, des taux d'AMPc, et de l'activité de la protéine kinase AMPc dépendante (PKA) (pour revue : Nestler, 2001). Il a été proposé que ce processus adaptatif pourrait correspondre à un phénomène commun à toutes les drogues d'abus, en réponse à une stimulation prolongée (pour revues : Nestler, 1997; Self & Nestler, 1998; Nestler, 2001). L'analyse plus détaillée de ces phénomènes a montré que selon le sous-type d'AC couplé au récepteur μ , la réponse à la morphine peut varier. Par exemple, la stimulation aiguë ou chronique des récepteurs μ couplés aux AC de type I et V induit respectivement une inhibition ou une activation de leur activité. En revanche, pour l'AC de type II, le résultat inverse est obtenu (Avidor-Reiss *et al.*, 1996; Eckhardt *et al.*, 2000).

Par ailleurs, ces adaptations ont été observées dans des régions spécifiques du système nerveux central. L'hyperactivité de la cascade de signalisation AMPc dépendante a ainsi été montrée dans les neurones noradrénergiques du locus coeruleus (Duman *et al.*, 1988; Nestler *et al.*, 1989; Shiekhattar & Aston-Jones, 1993), et est responsable de l'augmentation de la libération de noradrénaline observée au cours du sevrage des opiacés (Nestler *et al.*, 1993; Nestler, 1996; Lane-Ladd *et al.*, 1997). Ces neuroadaptations ont également été décrites au niveau du noyau accumbens (Terwilliger *et al.*, 1991), dans les interneurons GABAergiques de la VTA (Bonci & Williams, 1996, 1997), dans la PAG (Ingram *et al.*, 1998) ainsi que dans le noyau du raphé dorsal (Jolas *et al.*, 2000). Lors du sevrage, la désinhibition des récepteurs μ sur la voie de l'AMPc a pour principale conséquence d'augmenter la probabilité de libération du GABA dans la VTA (interneurones) et dans les voies de projections de l'Acb (Bonci & Williams, 1997). Ces modifications adaptatives, en particulier dans la VTA et l'Acb, ont été proposées comme étant le substrat moléculaire de l'état aversif développé au cours du syndrome de sevrage et de la vulnérabilité à la rechute après abstinence (Nestler & Aghajanian, 1997; Self & Nestler, 1998).

L'augmentation de l'AMPc intracellulaire induit par l'imprégnation morphinique a pour cible la PKA qui voit ainsi son activité augmenter (Figure 7B). L'inhibition de l'activité des protéines kinases dans

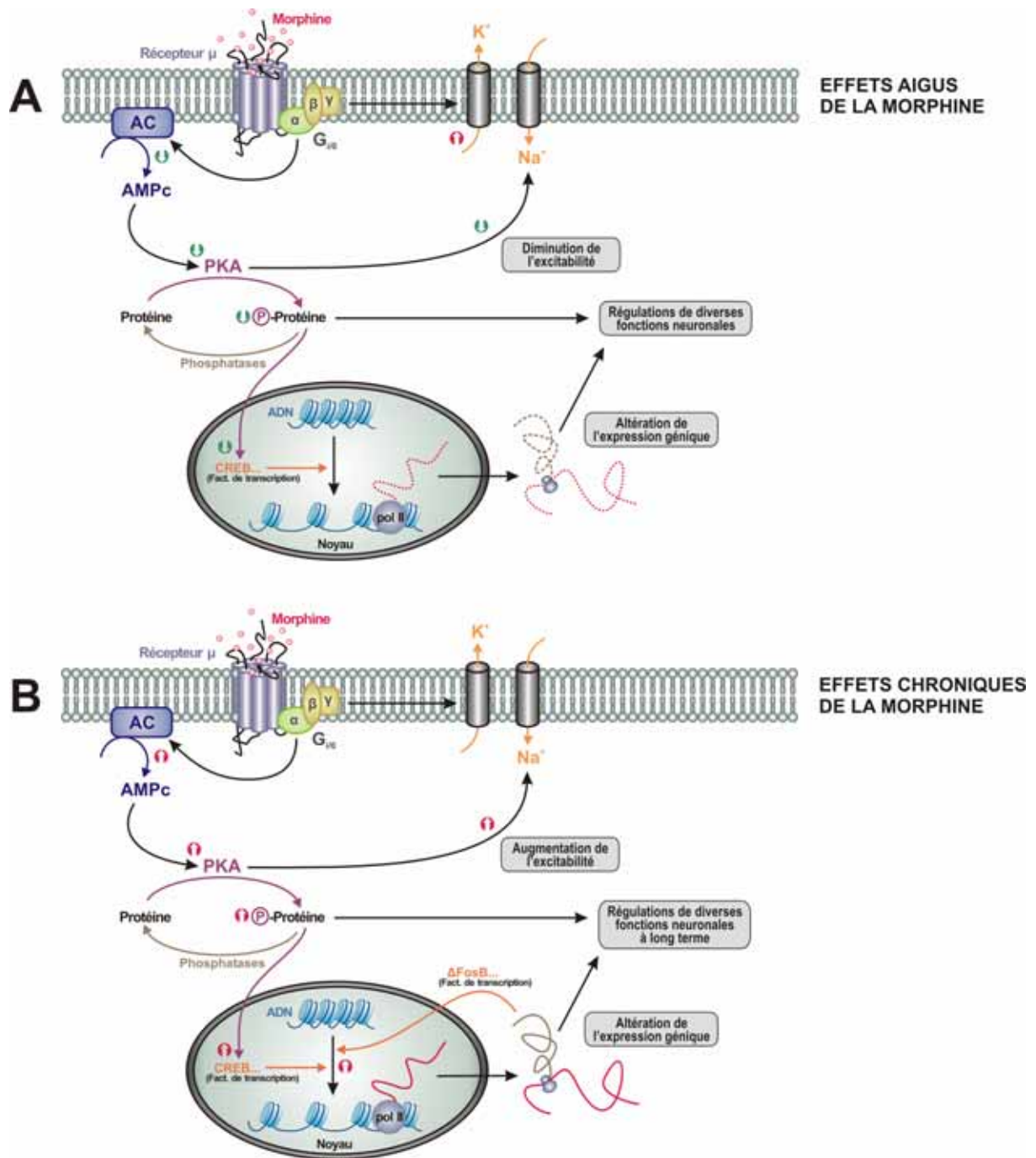


Figure 7. Représentation schématique des modifications engendrées par l'exposition aiguë et chronique à la morphine, au sein de la voie de transduction dépendante de l'AMPC dans les neurones du LC ou de l'Acb (d'après Nestler, 2001).

L'administration aiguë d'opiacés (A) inhibe la voie de l'AMPC et augmente la conductance au K^+ via la protéine $G_{12/13}$. Le blocage de la voie de l'AMPC entraîne des modifications des processus de signalisation intracellulaire (cascades de phosphorylation, etc...). L'ensemble de ces événements aboutit à des bouleversements du fonctionnement de la cellule : réduction de l'activité électrique du neurone et altération de la transcription des gènes. Dans le cas d'une exposition chronique aux opiacés (B), des adaptations compensatoires de la voie de l'AMPC se mettent en place. Au cours de l'état de dépendance, la voie AMPC est hyperactive, conduisant à une hyperexcitabilité du neurone et à des modifications persistante de la transcription des gènes. AC, adénylate cyclase ; PKA, protéine kinase AMPc-dépendante ; pol II, ARN polymérase.

l'Acb est capable de réduire l'aversion de place induite par la naloxone (Valverde *et al.*, 1996), suggérant que l'augmentation de l'activité de la PKA pourrait jouer un rôle dans ce phénomène. L'hyperactivation au sein des cascades de phosphorylation intracellulaires pourrait aboutir d'une part à l'augmentation progressive de l'excitabilité des neurones via l'activation des canaux ioniques Na⁺ voltage-dépendants (Nestler *et al.*, 1993; White *et al.*, 1998), et pourrait conduire d'autre part à un bouleversement complet de la régulation de l'expression génique via l'hyperactivation de CREB (Nestler, 2001). Une fois activé par phosphorylation, le facteur de transcription constitutif CREB passe dans le noyau de la cellule et vient se fixer sur des séquences CRE (« *cAMP response element* ») contenues dans la région promotrice des gènes pour permettre la transactivation de la transcription (Montminy *et al.*, 1990). Alors que l'injection aiguë de morphine inhibe la phosphorylation de CREB ainsi que son expression dans le locus coeruleus, le traitement chronique à la morphine reverse cet effet et le sevrage provoque une augmentation de la phosphorylation de CREB (Guitart *et al.*, 1992). L'infusion d'oligonucléotides antisens dirigés contre l'ARNm de CREB directement dans le LC prévient l'hyperactivation de l'AC induite par l'administration répétée de morphine et atténue l'activation des neurones noradrénergiques au cours du sevrage ainsi que certains des signes somatiques (Lane-Ladd *et al.*, 1997). En accord avec ces données, des souris déficientes pour une isoforme de la protéine CREB (souris knock-out) présentent un syndrome de sevrage moins important que des souris sauvages (Maldonado *et al.*, 1996).

Chez des souris génétiquement modifiées possédant un gène rapporteur LacZ (qui encode la β -galactosidase) en aval d'un promoteur contenant une séquence consensus CRE, le sevrage précipité par la naloxone provoque une augmentation de l'expression de la β -galactosidase dans l'Acb ainsi que dans d'autres structures cérébrales, comme le noyau central de l'amygdale (CeA) ou encore le LC, indiquant que l'imprégnation morphinique induit des adaptations de la transcription médiée par CRE (Barrot *et al.*, 2002; Shaw-Lutchman *et al.*, 2002). De manière intéressante, la surexpression de CREB dans l'Acb diminue les propriétés appétitives des stimuli associés à la morphine (préférence de place) ainsi que les propriétés aversives des stimuli associés au sevrage (aversion de place), alors que la surexpression d'un mutant dominant-négatif de CREB provoque exactement les effets inverses (Barrot *et al.*, 2002). L'ensemble de ces résultats suggère que l'activation de CREB au cours de la dépendance pourrait refléter un mécanisme adaptatif permettant de contrer les effets de la drogue. Ceci pourrait impliquer entre autre une augmentation de la libération de dynorphine dans le noyau accumbens (Carlezon *et al.*, 1998; Nestler, 2001). De plus, cette propriété semble indépendante de la valeur affective du stimulus, puisque aussi bien la préférence que l'aversion de place sont affectées. Ainsi, l'augmentation de CREB dans l'Acb pourrait permettre de diminuer la réponse émotionnelle globale de l'animal, sans pour autant prendre en considération la valence des stimuli affectifs.

Au niveau de la VTA, l'expression du gène rapporteur β -galactosidase médiée par la séquence consensus CRE est diminuée dans les neurones dopaminergiques et augmentée dans les neurones non-dopaminergiques au cours du sevrage (Shaw-Lutchman *et al.*, 2002). Ces données sont en accord avec les résultats montrant une diminution de l'activité du système mésolimbique au cours du sevrage (Acquas *et al.*, 1991; Pothos *et al.*, 1991; Acquas & Di Chiara, 1992; Rossetti *et al.*, 1992; Crippens & Robinson, 1994; Diana *et al.*, 1995; Diana *et al.*, 1999; Georges & Aston-Jones, 2003) qui

serait médiée par une augmentation de l'activité des interneurons GABAergiques dans la VTA (Bonci & Williams, 1997).

L'injection aiguë de diverses drogues est capable d'induire l'expression rapide et transitoire des facteurs de transcription inductibles de la famille Fos (cf. § I., Matériel & Méthodes) (pour revues : Hughes & Dragunow, 1995; Herdegen & Leah, 1998). En revanche, l'administration chronique de différentes drogues d'abus provoque l'accumulation persistante d'isoformes de la protéine Δ FosB (35 et 37 kDa) en particulier dans l'Acb (Figure 7B) (Nestler *et al.*, 2001). Il a été montré que l'accumulation de cette protéine au cours de la dépendance pouvait rendre compte du phénomène de sensibilisation comportementale (Kelz *et al.*, 1999) qui se traduit par une augmentation de certains effets de la drogue lors d'injections répétées. Ainsi, en modifiant directement la régulation de la transcription des gènes, les adaptations cellulaires et moléculaires mises en jeu au cours du traitement chronique à la morphine peuvent sous-tendre des adaptations à plus ou moins long terme au sein du système nerveux central et participer aux phénomènes addictifs (Kelz & Nestler, 2000; Nestler, 2001).

II.2.4. Apports des souris déficientes pour des récepteurs impliqués dans la dépendance aux opiacés

Chez les souris déficientes pour les différents types de récepteurs opioïdes, les altérations sont plus ou moins nombreuses selon que l'on s'adresse à tel ou tel sous-type de récepteur (pour revues : Kieffer, 1999; Gaveriaux-Ruff & Kieffer, 2002). L'ensemble de ces modifications est résumé sur la Figure 8 (d'après Gaveriaux-Ruff & Kieffer, 2002). Par exemple, pour les souris knock-out pour le récepteur μ (KO- μ), l'analgésie induite par la morphine est abolie, ainsi que la préférence de place à la morphine et les symptômes somatiques de sevrage précipité par la naloxone (Matthes *et al.*, 1996; Sora *et al.*, 2001). L'acquisition du comportement d'autoadministration intracérébral de morphine est également altérée chez ces souris KO- μ , révélant ainsi l'importance des récepteurs μ dans les processus de renforcement (Becker *et al.*, 2000). L'ensemble de ces données montre bien l'importance de ce sous-type des récepteurs opioïdes (μ) dans les différents effets associés à la morphine, qu'ils soient appétitifs ou aversifs. Les études concernant le récepteur κ montrent que les animaux KO- κ diffèrent des souris KO- μ puisqu'ils ne montrent aucune altération de la perception d'un stimulus douloureux (Simonin *et al.*, 1998). De plus, l'aversion de place conditionnée induite par l'administration d'un agoniste κ chez l'animal naif, ou bien par la naloxone chez l'animal morphino-dépendant, est diminuée chez les souris déficientes pour le récepteur κ (Simonin *et al.*, 1998), ce qui supporte l'hypothèse de l'implication de la stimulation de ces récepteurs par la dynorphine dans les effets aversifs du sevrage (pour revue : Nestler, 2001). L'étude du phénotype des souris déficientes pour le récepteur δ a montré une augmentation de l'anxiété chez ces animaux (Filliol *et al.*, 2000) ; facteur connu comme étant impliqué dans la vulnérabilité à développer un comportement addictif (cf. § III.1.2.b., ci-dessous) (pour revues : Piazza & Le Moal, 1998; Weiss *et al.*, 2001). Aussi, une étude montrant une augmentation de la préférence pour l'éthanol chez les animaux KO- δ par rapport aux animaux sauvages a suggéré que l'inhibition des processus médiés par les récepteurs δ pourrait être associée à une augmentation de la consommation de drogue (Roberts *et al.*, 2001).

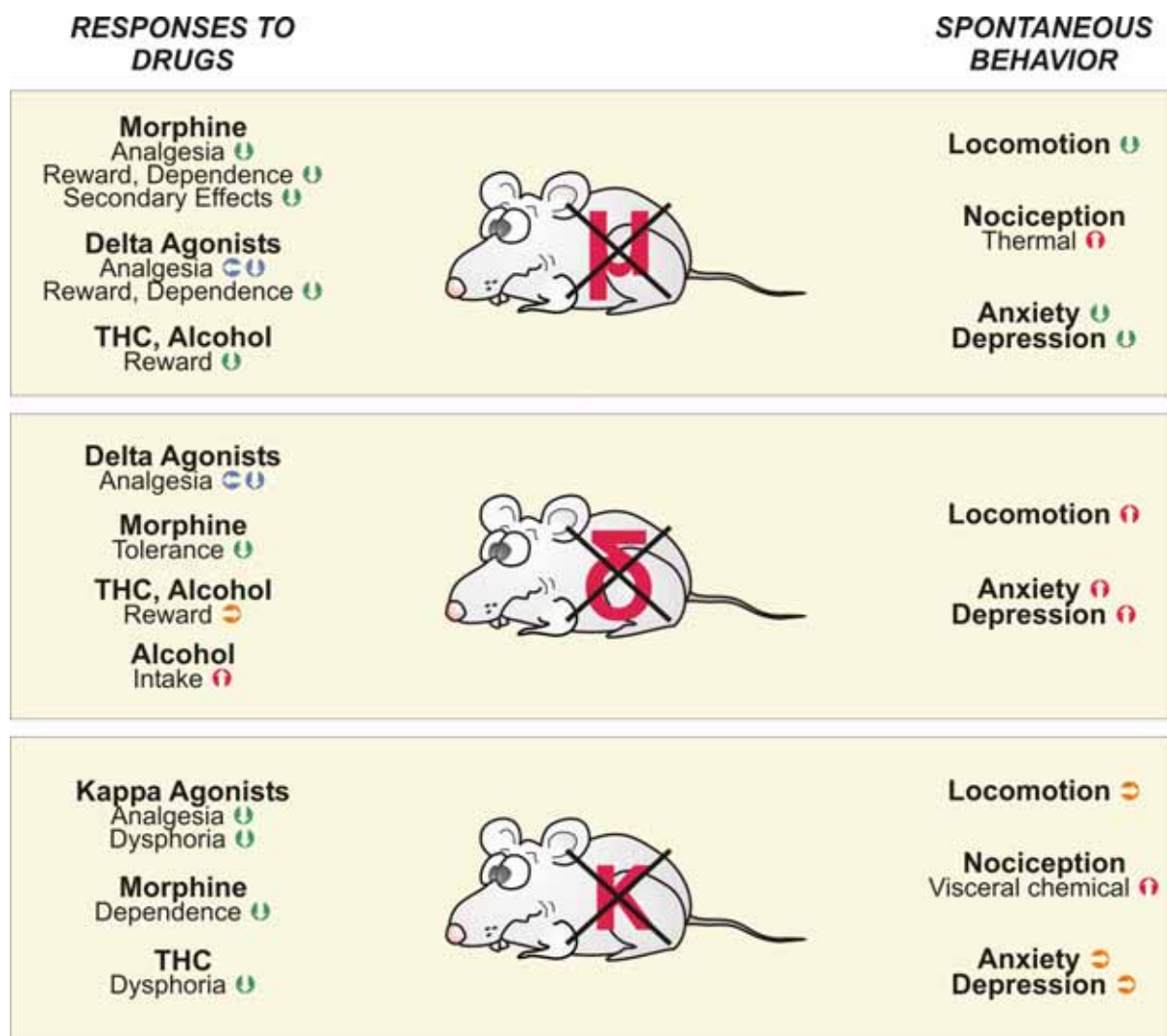


Figure 8. Réponses aux drogues et comportements spontanés chez des souris déficientes pour les différents sous-types de récepteurs opioïdes (μ , δ et κ) (d'après Gaveriaux-Ruff & Kieffer, 2002). Le type de souris knock-out est indiqué au milieu de la figure, les réponses à différentes drogues sont indiquées à gauche, et les comportements spontanés modifiés sont indiqués à droite. \rightarrow : non modifié ; \downarrow : diminué ou complètement aboli ; \uparrow : augmenté ; \downarrow : non modifié ou diminué selon les conditions expérimentales.

Les modèles d'animaux déficients ont également permis de démontrer que le récepteur μ était impliqué dans la réponse à d'autres drogues d'abus, comme par exemple le $\Delta 9$ -tetrahydrocannabinol (THC) ou l'éthanol. Les souris KO- μ sont altérées dans la consommation d'éthanol (Hall *et al.*, 2001a), indiquant une cible moléculaire pour les effets bénéfiques de la naltrexone dans les comportements alcooliques (la naltrexone diminue la consommation d'alcool) (pour revue : Herz, 1997). Dans le cas du THC, les modèles génétiques ont révélé l'existence d'interactions entre les systèmes opioïdes endogènes et le système des endocannabinoïdes. En effet, les effets renforçants du THC sont abolis chez les souris KO- μ (Ghozland *et al.*, 2002). De plus la morphine ne produit pas de préférence de place conditionnée chez des souris déficientes pour le récepteur CB₁ (récepteur des endocannabinoïdes) (Martin *et al.*, 2000). Enfin, une étude récente montre que la symptomatologie du sevrage des opiacés est augmentée chez des souris knock-out pour le récepteur A_{2A} de l'adénosine, alors que des animaux doublement mutés (KO-A_{2A}/CB₁) ne montrent aucune modification du sevrage précipité par la naloxone (Berrendero *et al.*, 2003), suggérant que ces deux récepteurs exercent des actions opposées au cours du développement de la dépendance à la morphine.

La participation de la transmission dopaminergique dans les réponses comportementales à la morphine a été étudiée par le biais du modèle des souris déficientes pour le transporteur de la dopamine (DAT) (Spielewoy *et al.*, 2000). Ces souris sont caractérisées par un déficit global de la transmission dopaminergique qui s'exprime fonctionnellement par une libération de dopamine élevée constitutive dans le complexe striatal (Giros *et al.*, 1996; Benoit-Marand *et al.*, 2000; Gonon *et al.*, 2000). Malgré le fait que la transmission dopaminergique soit déjà activée de manière tonique chez ces souris, la préférence de place à la morphine est augmentée par rapport au contrôle, ainsi que la libération de dopamine induite par la morphine (Spielewoy *et al.*, 2000). De plus, certains symptômes somatiques du sevrage précipité par la naloxone sont diminués, mais cependant, l'injection aiguë de morphine chez ces souris KO-DAT ne stimule pas l'activité locomotrice (Spielewoy *et al.*, 2000). Ces résultats suggèrent un rôle important de la transmission dopaminergique dans les effets renforçants des stimuli conditionnés aux effets appétitifs primaires de la morphine.

En ce qui concerne les souris déficientes pour le récepteur de type D₂ de la dopamine, il a été montré que, chez ces animaux, les effets renforçants des stimuli conditionnés à la morphine sont complètement abolis car ils ne montrent plus de préférence de place conditionnée induite par la morphine ; en revanche, l'expression de la composante somatique du sevrage précipité par la naloxone n'est pas affectée (Maldonado *et al.*, 1997). Cependant, selon une étude plus récente utilisant une souche de souris KO-D₂ différente, il a été montré que ces animaux étaient tout de même capables d'exprimer une préférence de place pour la morphine (Dockstader *et al.*, 2001). Néanmoins, ces souris ne montrent plus de préférence de place induite par la morphine lorsqu'elles sont dans un état de manque précipité par la naloxone (Dockstader *et al.*, 2001). Ces auteurs précisent dans leur discussion que la contradiction qui existe entre leurs résultats et les données de Maldonado *et al.* (1997), concernant la préférence de place à la morphine chez l'animal naïf, proviendrait de différences subtiles dans la technique utilisée pour générer les différentes souches de souris KO. Quoi qu'il en soit, ces données suggèrent que le récepteur de type D₂ joue un rôle important dans les aspects motivationnels de la dépendance des opiacés.

L'ensemble de ces données démontre que l'obtention de souris génétiquement modifiées, n'exprimant plus différents sous-types des récepteurs opioïdes ou dopaminergiques, représente un outil puissant pour établir des relations causales entre les aspects moléculaires et comportementaux de la dépendance aux drogues. De plus, dans le cas des récepteurs opioïdes, le développement de souris knock-out pour les trois types de récepteurs clonés (μ , δ , et κ) (Simonin *et al.*, 2001) pourrait permettre de montrer l'implication d'autres sous-types de récepteurs opioïdes (dont l'existence a été initialement suggérée par des études de pharmacologie, et qui, à l'heure actuelle, ne sont pas encore caractérisés d'un point de vue moléculaire) dans de nombreuses réponses. Cependant, il est crucial de garder à l'esprit que chez ces souris génétiquement modifiées, de nombreuses adaptations du système nerveux central sont susceptibles de se mettre en place, ce qui représente une limite à l'utilisation de tels modèles. Néanmoins, le développement de systèmes inductibles, dans lesquels l'expression d'un gène donné peut être activée ou réprimée dans une population de neurone précise et pendant un laps de temps défini, représente un outil très prometteur dans ce domaine.

II.3. Modèles d'étude de la dépendance et du sevrage des opiacés

II.3.1. Induction de la dépendance aux opiacés

Chez le rongeur, hormis le modèle d'autoadministration intraveineuse de drogue dans lequel l'animal contrôle sa propre intoxication, il existe deux protocoles qui permettent d'induire la dépendance aux opiacés (morphine ou héroïne), et qui présentent chacun leurs avantages et leurs inconvénients en fonction du type d'expérience à réaliser.

① La manière la plus classique pour induire une dépendance aux opiacés chez le rat consiste à injecter de la morphine (en général par voie intra-péritonéale) de façon répétée (deux fois par jour pendant quatorze jours au maximum) en utilisant des doses croissantes, allant selon les modèles, de 5 à 90 mg/kg (Caillé *et al.*, 1999), ou de 20 à 240 mg/kg (Acquas & Di Chiara, 1992). La morphine peut également être remplacée par des injections répétées d'héroïne, mais dans ce cas, les doses sont plus faibles (2 à 18 mg/kg). Dans ce type de protocole, l'état de manque est obtenu dès l'arrêt du traitement (sevrage par abstinence), mais il est également fréquent que les animaux commencent à ressentir les effets du sevrage pendant l'intervalle séparant deux injections de morphine. Cette méthode a pour avantage de modéliser le mode d'administration intermittent de la drogue chez le toxicomane.

② Pour les études basées sur l'analyse du syndrome de sevrage aigu, ou encore les études de conditionnement des effets aversifs du sevrage, la dépendance est induite par l'implantation sous-cutanée de pastilles de morphine à libération lente (NIDA, « *National Institute on Drug Abuse* », USA). Chez le rat adulte pesant environ 200 g, une efficacité maximale peut être obtenue avec deux pastilles contenant 75 mg de morphine base chacune. La libération de morphine reste constante au cours des deux semaines qui suivent l'implantation, et une dépendance totale est obtenue dans les 24 hr suivant l'implantation (Gold *et al.*, 1994). Cette méthode présente l'énorme avantage de pouvoir contrôler de façon parfaite en terme temporel le déclenchement d'un syndrome de sevrage précipité par l'injection d'un antagoniste des récepteurs μ (naloxone ou naltrexone). De plus, les animaux sont constamment

sous l'emprise de la morphine et n'expérimentent pas de syndrome de sevrage spontané, comme ce peut être le cas dans le protocole d'injections. Ce protocole d'induction de la dépendance est donc la méthode de choix pour les études de conditionnement des effets aversifs du sevrage, qui nécessitent de pouvoir contrôler la contingence temporelle entre syndrome de sevrage et présentation des stimuli environnementaux. Ainsi, dans toute notre étude, les animaux seront rendus morphino-dépendants par implantation sous-cutanée de pastilles de morphine à libération lente.

II.3.2. Modèles d'étude du syndrome de sevrage des opiacés

II.3.2.a. Symptomatologie du sevrage des opiacés

Dans le cas des addictions aux narcotiques opiacés, la symptomatologie du syndrome de sevrage est bien caractérisée chez l'homme et les symptômes du manque apparaissent selon une chronologie bien précise. Au cours de la première phase, l'individu est dans un état dysphorique, anxieux et irritable (Jaffe, 1990). Ce sont les prémices du syndrome de sevrage qui apparaissent dans les six premières heures qui suivent la dernière prise de drogue. De manière intéressante, aucune manifestation somatique n'est observée au cours de cette période précoce de sevrage, et il a été proposé que le désir de soulager cet état de mal-être aversif pourrait contribuer au maintien du comportement de prise de drogue (composante motivationnelle du sevrage) (pour revues : Koob, 1996; Bechara *et al.*, 1998; Koob & Le Moal, 2001). Au cours des heures qui suivent l'émergence de cet état affectif négatif généralisé, l'intensité du syndrome de sevrage augmente progressivement et de nombreuses manifestations somatiques apparaissent alors de façon chronologique. Le tableau ci-dessous illustre le décours temporel de la symptomatologie du sevrage des opiacés chez l'homme (d'après O. Ray & C. Ksir, « *Drug society and human behavior* », 1999).

Séquence d'apparition des différents symptômes du syndrome de sevrage des opiacés	Nombre d'heure après la dernière prise de morphine ou héroïne
Dysphorie, anxiété, besoin compulsif de drogue	6
Bâillements, sudation, rhinorrhée	14
Pupilles dilatées, pilo-érection, tremblements, douleurs osseuses et musculaires, perte d'appétit	16
Insomnie, nervosité, nausées, augmentation de la pression artérielle, de la température corporelle, des battements cardiaques, du rythme respiratoire	24 à 36
Vomissements, diarrhée, perte de poids, éjaculation ou orgasme spontané, augmentation de la glycémie, prise de posture de type fœtale	36 à 48

Chez le rat morphino-dépendant, ces deux états (motivationnel et somatique) qui en réalité forment un continuum temporel existent également lors d'un syndrome de sevrage spontané. Dans le cas du sevrage précipité par la naloxone, il est possible de modéliser ces deux états en fonction de la dose de naloxone utilisée (Schultheis *et al.*, 1994). En effet, la composante motivationnelle du sevrage peut être révélée par le conditionnement des effets aversifs de sevrage, et il est possible d'induire une aversion de place conditionnée robuste chez le rat morphino-dépendant en utilisant de très faibles

doses de naloxone, et dont la mémoire perdure jusqu'à au moins quatre mois après abstinence (Stinus *et al.*, 2000). En revanche, des doses plus élevées de naloxone sont nécessaires pour précipiter un syndrome de sevrage complet, incluant les manifestations somatiques (Schultheis *et al.*, 1994).

II.3.2.b. Modèles d'étude de la composante motivationnelle du sevrage

La composante motivationnelle précoce du sevrage des opiacés peut être mise en évidence dans différents modèles comportementaux : ① l'aversion de place conditionnée (Mucha, 1987; Hand *et al.*, 1988), ② le modèle de Baldwin (Baldwin & Koob, 1993), et ③ l'autostimulation électrique intracrânienne (Schultheis *et al.*, 1994).

① Le principe de l'aversion de place conditionnée est d'associer de façon répétée les effets d'un syndrome de sevrage précipité par la naloxone chez le rat morphino-dépendant à un environnement spécifique (en général un compartiment d'un dispositif à deux ou à trois sous-divisions spécifiques). Lorsque l'animal est par la suite réexposé à cet environnement (sans aucune injection de naloxone), il va tout faire pour s'en échapper, et exprime ainsi une aversion de place conditionnée. Ce phénomène montre que l'état de malaise général engendré par le syndrome de sevrage des opiacés peut être transféré à des stimuli environnementaux, qui par la suite seront capables d'influencer le comportement de l'animal. Dans cette situation, le type d'association formée est caractéristique d'un conditionnement de type Pavlovien dans lequel un stimulus inconditionné (US ; ici, le sevrage) est associé de façon contingente avec un stimulus conditionné (CS ; environnement). En revanche, la réponse que l'on mesure lors du test d'aversion de place n'est pas une réponse de type Pavlovienne au sens strict du terme, puisque l'animal « se comporte » pour exprimer un comportement motivé et adapté (aversion de place) par rapport à la représentation qu'il se fait du CS.

② Le principe du modèle de Baldwin est l'interruption d'une réponse opérante de l'animal (la réponse peut être par exemple, l'appui sur un levier pour obtenir de la nourriture). Dans ce modèle, le sevrage est précipité par la naloxone chez le rat morphino-dépendant qui est engagé dans une réponse opérante, et est associé à la présentation d'un stimulus sonore ou odorant. L'état aversif déclenché par le sevrage interrompt alors la réponse opérante dans laquelle l'animal est engagé. Ultérieurement, lorsque l'animal sera replacé dans la cage de test, la seule présentation de ces mêmes stimuli sonores ou odorants (stimuli conditionnés) sera également capable d'interrompre la réponse opérante de l'animal.

③ Contrairement aux deux modèles précédents, l'autostimulation électrique intracrânienne ne fait pas intervenir de procédures de conditionnement. Dans ce modèle, des animaux apprennent à s'autostimuler électriquement une région spécifique du cerveau (faisceau médian du télencéphale – région où passent les fibres dopaminergiques issues de la VTA) jusqu'à atteindre un seuil d'autostimulation stable. Chez le rat morphino-dépendant, de très faibles doses de naloxone (qui ne précipitent pas de signes somatiques de sevrage) provoquent une augmentation des seuils d'intensité d'autostimulation (Schultheis *et al.*, 1994), ce qui équivaut à une diminution de la récompense induite par l'autostimulation électrique du faisceau médian du télencéphale. Ceci suggère que l'administration

de faibles doses de naloxone est ainsi capable de générer un état de malaise dysphorique chez le rat morphino-dépendant.

II.3.2.c. Modèles d'étude de la composante somatique du sevrage

L'évaluation de la composante somatique du syndrome de sevrage des opiacés chez l'animal est basée sur la quantification d'un large éventail de comportements après l'administration de fortes doses de naloxone chez un rat morphino-dépendant : « *weight loss* » (perte de poids), « *jumping* » (sauts), « *writhing* » (torsions abdominales), « *body shake* » (ébrouements), « *diarrhea* » (diarrhées), « *teeth chattering* » (claquements de dents), « *swallowing* » (déglutition), « *salivation* » (salivation), « *chromodacryorrhea* » (chromodacryorrhée), « *ptosis* » (ptosis), « *mastication* » (mâchonnements), « *vocalization* » (vocalisations au toucher), « *eyes twitches* » (clignement des yeux), et « *rhinorrhea* » (rhinorrhée).

Selon l'échelle de quantification globale de Gellert-Holtzman, certains de ces indices du sevrage somatique sont quantifiés de manière graduelle alors que d'autres sont quantifiés selon leur présence ou leur absence (Gellert & Holtzman, 1978). Une autre méthode, l'étho-score d'Espejo, permet également d'obtenir un score de sevrage global mais est uniquement basée sur la fréquence de mastication et la perte de poids (Espejo *et al.*, 1995). Le score global de Gellert-Holtzman présente une progression asymptotique en fonction de doses croissantes de naloxone (« effet plafond »), alors que l'étho-score d'Espejo progresse de façon linéaire (Espejo *et al.*, 1995).

III. RENFORCEMENT, MOTIVATION ET ADDICTION

III.1. Définitions de l'addiction

III.1.1. Définitions officielles d'après le CIM 10 (1992) et le DSM IV (1994)

Le mot addiction, issu du droit romain ancien, renvoie à la notion d'esclavage et est un synonyme d'assuétude. Ainsi, le terme addiction est fortement explicite de la relation qui lie le toxicomane à la drogue. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (CIM 10, 1992) et l'Association Américaine de Psychiatrie (DSM IV, 1994), la consommation de substances psychoactives s'articule autour de trois comportements distincts : l'usage, l'usage nocif (ou abus) et la dépendance (Tableau 2). L'usage correspond à une consommation de drogue régulière ou non, mais contrôlée, et qui n'entraîne ni complications, ni dommages pour l'homme. L'abus est caractérisé par une consommation de substances psychoactives susceptibles d'induire des dommages somatiques, psychoaffectifs ou sociaux, soit pour l'individu lui-même, soit pour son entourage. La dépendance, quant à elle, représente une entité psychopathologique et comportementale en rupture totale avec le fonctionnement habituel du sujet.

Dans le cas des addictions aux substances opiacées (morphine, héroïne), l'état de dépendance physique se caractérise par l'émergence d'un syndrome de sevrage au cours duquel apparaissent de

ABUS

DEPENDANCE

SEVRAGE DES OPIACES

selon le DSM IV

Présence d'au moins une des manifestations suivantes au cours d'une période de 12 mois

- 1 Utilisation répétée d'une substance conduisant à l'incapacité de remplir des obligations majeure au travail, à l'école ou à la maison
- 2 Utilisation répétée d'une substance dans des situations comportant une dangerosité physique (conduite d'un véhicule...)
- 3 Problème judiciaires répétés liés à l'utilisation d'une substance psychoactive
- 4 Poursuite de l'usage de la substance malgré des problèmes relationnels et sociaux, persistant ou récurrents, causés ou exacerbés par les effets de la substance psychoactive

selon le DSM IV

Présence d'au moins 3 des 7 manifestations suivantes au cours d'une période de 12 mois

- 1 **Tolérance** : besoin de quantités majorées pour obtenir l'effet désiré ; effet diminué en cas d'usage continu de la même quantité de substance
- 2 **Sevrage**, dont témoigne soit un syndrome de sevrage caractéristique de la substance, soit la nécessité de prendre la même substance pour soulager ou éviter les symptômes de sevrage
- 3 Substance prise en quantité supérieure ou sur un laps de temps plus long que ce que la personne avait envisagé ou souhaité
- 4 Temps considérable passé à faire le nécessaire pour se procurer la substance, la consommer, ou récupérer de ses effets
- 5 Abandon d'importantes activités sociales, occupationnelles ou de loisir en raison de l'usage
- 6 Poursuite de la consommation malgré la connaissance d'un problème physique ou psychologique persistant ou récurrent déterminé ou exacerbé par la substance
- 7 Désir persistant ou efforts infructueux pour réduire ou contrôler la consommation

selon le CIM 10

Présence d'au moins une des manifestations suivantes au cours d'une période de 12 mois

- 1 Désir puissant et compulsif d'utiliser une substance psychoactive
- 2 Diminution de la capacité de contrôle de l'usage de la substance
- 3 **Sevrage** physiologique quand le sujet diminue ou arrête la consommation ; en témoigne la survenue d'un syndrome de sevrage caractéristique de la substance ou la nécessité d'utiliser la même substance pour soulager ou éviter les symptômes de sevrage
- 4 **Tolérance** aux effets de la substance psychoactive : le sujet a besoin d'une quantité plus importante de la substance pour obtenir l'effet désiré
- 5 Abandon progressif d'autres sources d'intérêt et de plaisir, et augmentation du temps consacré à l'obtention de la substance, à sa consommation ou à la récupération de ses effets
- 6 Poursuite de la consommation de la substance psychoactive malgré la survenue de conséquences manifestement nocives (physiques, psychiques et sociales)

selon le DSM IV

- A -
L'une ou l'autre des circonstances suivantes

- 1 Arrêt ou réduction d'une consommation importante ou prolongée d'opiacés
- 2 Administration d'un antagoniste des opiacés chez un consommateur

- B -
Au moins 3 des signes suivants se développant de quelques minutes à quelques jours après le critère A

- 1 Dysphorie
- 2 Nausées ou vomissements
- 3 Douleurs musculaires
- 4 Larmoiements, rhinorrhée
- 5 Dilatation pupillaire, pilo-érection
- 6 Diarrhées
- 7 Baillements
- 8 Fièvre
- 9 Insomnie

selon le CIM 10

- A -
L'une ou l'autre des circonstances suivantes

- 1 Interruption ou réduction récente de la prise d'une substance dont l'utilisation antérieure était répétée et habituellement prolongée, et/ou importante
- 2 Peut survenir avec l'administration d'un antagoniste des récepteurs opiacés

- B -
Au moins 3 des signes suivants correspondant aux caractéristiques connues du syndrome de sevrage des opiacés

- 1 Désir impérieux de prendre un opiacé
- 2 Rhinorrhée, éternuements
- 3 Douleurs ou crampes musculaires
- 4 Larmoiements
- 5 Crampes abdominales
- 6 Nausées ou vomissements
- 7 Diarrhées
- 8 Dilatation pupillaire
- 9 Pilo-érection
- 10 Tachycardie, hypertension
- 11 Baillements
- 12 Sommeil agité

Tableau 2. Définitions de l'usage nocif (abus), de la dépendance et du syndrome de sevrage des opiacés selon le DSM IV publié par l'Association Américaine de Psychiatrie (1994) et le CIM 10 publié par l'Organisation Mondiale de la Santé (1992).

nombreux signes somatiques lors de la cessation de la consommation de drogue (Tableau 2). Néanmoins, comme nous l'avons déjà discuté précédemment, la composante somatique du sevrage est précédée d'un état de malaise aversif (composante motivationnelle du sevrage) au cours duquel l'individu ressent un désir pressant et compulsif (« *craving* ») de consommer à nouveau la drogue (pour revues : Koob, 1996; Bechara *et al.*, 1998; Nestler, 2001). Cet état affectif particulier définit la dépendance psychique qui est une caractéristique commune à toutes les drogues d'abus et qui caractérise le mieux les conduites addictives. Le DSM IV et le CIM 10 prennent bien en considération la dépendance psychique et mettent au premier plan des caractéristiques du sevrage des opiacés, un état dysphorique (pour le DSM IV), et un désir impérieux de prendre un opiacé, ou « *craving* » (pour le CIM 10) (Tableau 2).

L'addiction peut donc se définir comme un comportement pathologique ayant pour fonction de procurer du plaisir et/ou de soulager un malaise intérieur, et qui se caractérise par l'échec répété de son contrôle et sa persistance en dépit des conséquences négatives (Goodman, 1990). De plus, il est important de garder à l'esprit que les conduites addictives sont associées non seulement à la consommation compulsive et non contrôlée de drogues d'abus, mais également à de nombreux comportements qui n'impliquent pas l'utilisation de substance psychoactive exogène (dépendances affectives, au travail, aux jeux d'argent, à l'activité physique ou sexuelle, troubles du comportement alimentaire – anorexie/boulimie, kleptomanie, conduites d'achat compulsif, etc...).

III.1.2. L'addiction : une interaction drogue – individu – environnement

III.1.2.a. L'addiction : un désordre lié à une substance ?

Les définitions de l'usage, de l'abus et de la dépendance citées ci-dessus mettent en avant les effets de la drogue elle-même pour expliquer l'addiction (pharmacodépendance), mais impliquent de façon sous-entendue que tous les individus qui sont amenés à consommer une drogue pour une raison ou une autre ne tombent pas forcément dans la spirale de la dépendance et de l'addiction. Un bon exemple de ce phénomène est la consommation d'alcool, de nicotine ou de cannabis, pour lesquels un usage contrôlé et modéré, sans conséquences négatives massives pour la santé, semble possible et fréquent. Bien que les phénomènes de pharmacodépendance soient importants, de nombreuses données de la littérature montrent que, pour que l'addiction se mette en place, deux facteurs supplémentaires semblent déterminants : l'individu et l'environnement.

III.1.2.b. L'individu : importance des facteurs génétiques et de la réponse au stress dans la vulnérabilité aux drogues d'abus

L'étude des différences individuelles dans la vulnérabilité à développer une addiction à une drogue d'abus montre que les caractéristiques psychobiologiques du sujet, comme par exemple le patrimoine génétique, ou encore le sexe, jouent un rôle déterminant (Koob & Le Moal, 2001). De manière intéressante, il a été montré que la réponse comportementale à la nouveauté pouvait prédire la vulnérabilité de l'individu à la prise de drogue (Dellu *et al.*, 1996). En effet, les rats les plus réactifs à la nouveauté qualifiés de « *high-responders* » (HR) se révèlent plus sensibles à l'autoadministration

d'amphétamine que des rats moins réactifs (LR pour « *low-responders* ») (Piazza *et al.*, 1989), et cet effet semble dépendre de différences dans le fonctionnement de l'axe corticotrope. Les rats HR présentent une sécrétion de corticostérone nettement prolongée par rapport aux rats LR en réponse à l'exposition à un environnement nouveau (Piazza *et al.*, 1991a; Piazza *et al.*, 1993). De plus, les rats HR présentent un niveau d'activité du système dopaminergique supérieur à celui des rats LR dans le noyau accumbens (Acb), à la fois en condition basale et en réponse au stress (Piazza *et al.*, 1991b; Rouge-Pont *et al.*, 1993). Ainsi, le stress est une composante essentielle pour la vulnérabilité à développer une dépendance, et a également été isolé comme facteur précipitant la rechute après abstinence (pour revues : Piazza & Le Moal, 1998; Weiss *et al.*, 2001).

III.1.2.c. L'environnement associé à l'abus de drogue

Les circonstances dans lesquelles une substance addictive est consommée apparaissent également déterminantes dans la capacité à développer une addiction. L'exemple le plus marquant de l'effet de l'environnement associé à la prise de drogue sur le développement d'une addiction concerne la facilité avec laquelle les vétérans de la guerre du Vietnam – ayant développé une forte consommation de narcotiques opiacés pendant la guerre – stoppèrent spontanément l'usage de la drogue dès leur retour aux Etats-Unis (Robins, 1993). Ce phénomène est principalement dû à la différence de contexte entre les deux pays. En effet, au Vietnam, les soldats étaient dans une situation très stressante, sans famille pour les juger, et avaient accès facilement à de l'héroïne, qui plus est de bonne qualité, et bon marché.

Les stimuli environnementaux associés à la prise de drogue et/ou à son sevrage jouent un rôle capital dans l'induction conditionnée du « *craving* » chez l'homme (Wikler, 1965, 1973; O'Brien *et al.*, 1992). Ces phénomènes de conditionnement des effets appétitifs et aversifs des drogues à un environnement spécifique sont à la base du principe de la préférence de place conditionnée induite par la morphine chez le rat naïf, et de l'aversion de place conditionnée induite par la naloxone chez l'animal morphino-dépendant. De plus, la présentation de stimuli préalablement associés au syndrome de sevrage des opiacés est capable de déclencher l'expression conditionnée de symptômes somatiques de sevrage chez le rat morphino-dépendant (Wikler & Pescor, 1967; Wikler *et al.*, 1971). De nombreuses études ont également montré l'importance des stimuli conditionnés dans la rechute après abstinence chez l'animal (pour revues : Siegel, 1999; Stewart, 2000; Weiss *et al.*, 2001; Shalev *et al.*, 2002), ainsi que dans le maintien de la consommation de drogue, en particulier pour les stimuli associés au sevrage des opiacés (Ahmed *et al.*, 2000; Hutcheson *et al.*, 2001; Harris & Aston-Jones, 2003). D'un point de vue neurobiologique, le noyau basolatéral de l'amygdale (BIA) apparaît comme un substrat essentiel pour la réinstallation du comportement de prise de drogue induit par les stimuli conditionnés chez l'animal abstinent (Meil & See, 1997; Grimm & See, 2000). Par ailleurs, ces effets semblent impliquer des mécanismes médiés par l'action de la dopamine sur des récepteurs de type D₁ dans l'amygdale (Weiss *et al.*, 2000; Ciccocioppo *et al.*, 2001; See *et al.*, 2001).

L'ensemble de ces données montre que, par des processus d'apprentissage associatif de type Pavloviens (conditionnement classique), des stimuli environnementaux à l'origine « neutres » peuvent

acquérir des propriétés incitatives propres (motivationnelles) par association répétée avec les effets positifs ou négatifs des drogues, et par la suite contrôler le comportement de recherche de drogue (pour revues : Stewart *et al.*, 1984; Stewart & Eikelboom, 1986). L'importance des stimuli conditionnés dans les phénomènes addictifs a surtout été étudiée en relation avec les propriétés renforçantes appétitives des psychostimulants (cocaïne, amphétamine) et sera discutée de manière plus détaillée dans le Chapitre 2.

III.2. Neuropsychobiologie du renforcement et de la motivation : implications pour les théories de l'addiction

III.2.1. Modèles du renforcement positif et du renforcement négatif

Les premiers modèles explicatifs de l'addiction ont postulé que la motivation à consommer une drogue d'abus résulterait principalement d'une conjonction de deux processus : la drogue serait consommée pour les effets euphorisants qu'elle procure (renforcement positif) (Wise, 1978, 1996b), ou bien pour éviter les effets aversifs du syndrome de sevrage (renforcement négatif) (Koob & Bloom, 1988; Koob *et al.*, 1989; Koob *et al.*, 1997). Cependant, ces deux modèles peuvent difficilement expliquer le caractère compulsif (perte de contrôle sur la consommation de drogue) et récurrent (vulnérabilité à la rechute chez l'individu abstiné) de l'addiction qui très souvent s'accompagne plutôt d'une diminution des effets euphorisants de la substance. En outre, certaines drogues d'abus comme par exemple les psychostimulants ne provoquent pas de symptômes somatiques sévères de sevrage, mais sont pourtant très addictives.

III.2.2. « The incentive-sensitization theory »

Partant du constat que les modèles de renforcement positif et négatif étaient insuffisants pour expliquer l'ensemble des caractéristiques des comportements addictifs, Terry E. Robinson & Kent C. Berridge ont proposé le concept de l'« *incentive-sensitization* » (Robinson & Berridge, 1993, 2000). Cette théorie se base sur le modèle de l'« *incentive-motivation* » initialement formulé par Bindra (1978), et postule ① que les substances potentiellement addictives partagent la capacité de bouleverser le fonctionnement normal du système nerveux central à plus au moins long terme (neuroadaptations), ② que les substrats neurobiologiques modifiés par les drogues incluent ceux qui sont normalement impliqués dans les processus de motivation et de récompense, ③ que les neuroadaptations induites par l'usage répété de drogue d'abus produisent une sensibilisation de la réactivité du circuit de récompense (système dopaminergique mésocorticolimbique) aux effets des drogues et des stimuli conditionnés à leurs effets, et ④ que les circuits neuronaux sensibilisés ne sous-tendent pas les effets euphorisants des drogues (définis par le terme « *liking* »), mais qu'ils génèrent plutôt un état psychologique particulier (« *wanting* ») qui serait responsable de la recherche compulsive de drogue.

D'un point de vue neurobiologique, la théorie de l'« *incentive-sensitization* » est basée sur le fait que l'administration répétée et intermittente de drogue d'abus est capable d'induire une sensibilisation

comportementale persistante (i.e. augmentation des effets de la drogue), qui est de manière générale corrélée à une potentialisation de la libération de dopamine dans l'Acb (Kalivas & Stewart, 1991). Les phénomènes de sensibilisation affectent non seulement les effets psychomoteurs des drogues mais également leurs effets renforçants et motivationnels (Stewart & Badiani, 1993; Schenk & Partridge, 1997), et pourraient participer ainsi à la perte de contrôle sur la prise de drogue et à la vulnérabilité à la rechute (De Vries *et al.*, 1998; De Vries *et al.*, 1999; Deroche *et al.*, 1999). De manière intéressante, la sensibilisation comportementale et neurochimique peut également être induite par une exposition unique à l'amphétamine ou à la morphine, indiquant que la première exposition à la drogue n'est pas sans conséquence pour l'organisme (Vanderschuren *et al.*, 1999; Vanderschuren *et al.*, 2001). De plus, la sensibilisation comportementale est un processus « contexte-dépendant » et conditionnable puisque fortement modulé par l'environnement dans lequel la drogue a été administrée (Pert *et al.*, 1990; Anagnostaras & Robinson, 1996; Tirelli & Terry, 1998).

De nombreux phénomènes adaptatifs ont été décrits chez des animaux sensibilisés aux effets de diverses drogues d'abus, en particulier au niveau du système dopaminergique mésolimbique. Ces adaptations peuvent engendrer des modifications du contrôle de la libération de dopamine au niveau présynaptique (pour revue : Kalivas & Stewart, 1991), de la sensibilité des récepteurs postsynaptiques (pour revues : White & Kalivas, 1998; Wolf, 1998), ou encore des modifications morphologiques au niveau des neurones efférents de l'Acb et du cortex préfrontal (Robinson & Kolb, 1997, 1999b, a), suggérant que la sensibilisation pourrait résulter de la réorganisation structurale (connexions synaptiques) à l'intérieur du système de récompense.

III.2.3. « The hedonic homeostatic dysregulation theory »

Dans ce modèle Michel Le Moal & George F. Koob argumentent que les processus mis en jeu dans l'addiction et qui favorisent le passage d'une consommation modérée de drogue à un usage compulsif résulteraient d'une dérégulation de l'homéostasie hédonique (Koob & Le Moal, 1997, 2001). Cette théorie est basée sur le modèle des processus opposants (Solomon & Corbit, 1974) qui postule qu'un état affectif positif ou négatif est automatiquement contré par des processus au sein du système nerveux central, dont le but est de réduire l'intensité de cet état affectif. Dans le cas des drogues d'abus, l'effet appétitif associé à la consommation de drogue serait sous-tendu par des processus hédoniques positifs supposés stables dans le temps, et qui seraient opposés par des mécanismes mettant en jeu des processus hédoniques négatifs, qui apparaîtraient progressivement et qui seraient susceptibles de se renforcer au fur et à mesure des contacts répétés avec la drogue. Ainsi, l'état de dépendance résulterait de la mise en place de nombreuses neuroadaptations persistantes dans le système nerveux central, qui s'opposeraient aux effets aigus de la drogue. Le syndrome de sevrage ne représenterait alors que l'expression comportementale de ces diverses neuroadaptations.

La Figure 9 illustre les bases neurobiologiques sur lesquelles repose la théorie de la dérégulation de l'homéostasie hédonique (d'après Koob & Le Moal, 2001). Dans ce schéma, trois circuits majeurs sont supposés modifiés par l'usage de la drogue : le système de récompense (en vert), le système du stress (en rouge) et la boucle striato-thalamo-corticale (STC, en bleu). Chez l'individu non dépendant,

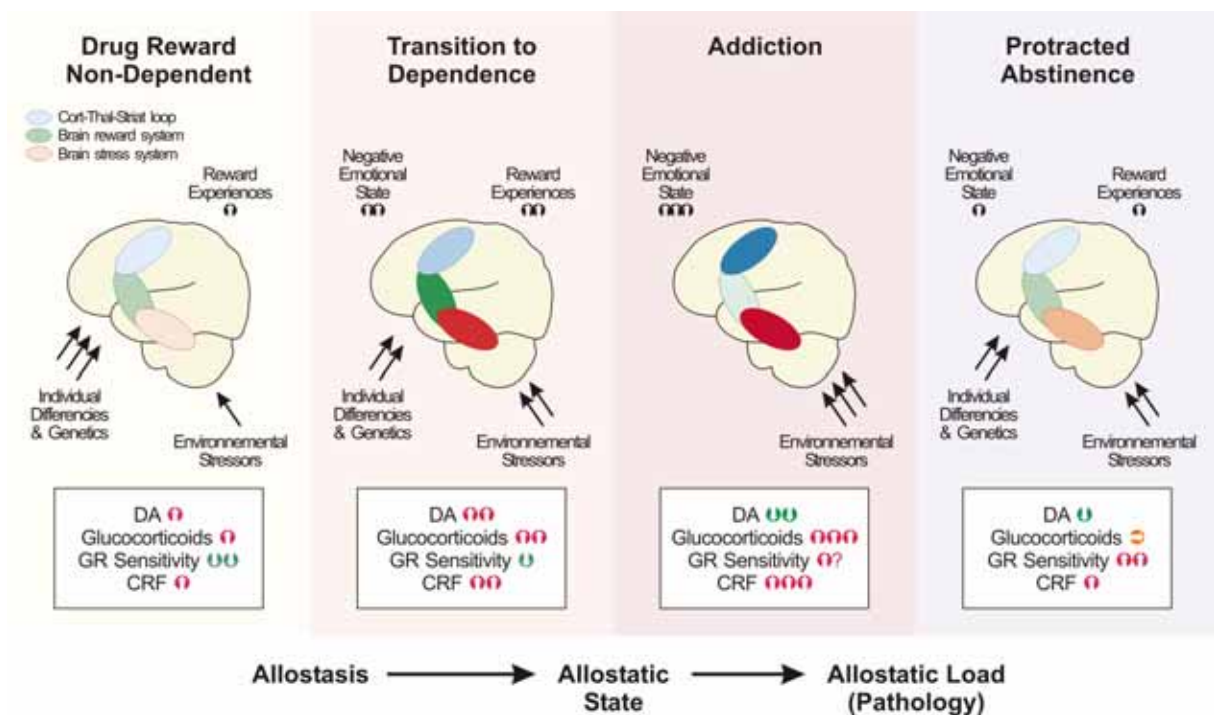


Figure 9. Illustration des fondements neurobiologiques du passage de l'usage à l'abus de drogue selon la théorie de la dérégulation de l'homéostasie hédonique (d'après Koob & Le Moal, 2001). Voir texte pour plus d'explications. DA, dopamine ; CRF, hormone corticotrope ; GR, récepteur aux glucocorticoïdes. « *Allostasis* » (allostasie) : processus permettant d'atteindre la stabilité par le changement. « *Allostatic load* » (charge allostatique) : « coût » des modifications pour le cerveau, qui s'accumule au cours du temps et qui reflète un état pathologique et l'accumulation de dommages.

le stress environnemental est minimal, les processus de récompense sont normaux et le système du stress et la boucle STC ne sont pas recrutés. Pendant la transition vers l'état de dépendance, les trois circuits sont recrutés, et chez l'individu dépendant (« *addiction* » dans le diagramme), le circuit de récompense est hypoactif, alors que les deux autres systèmes sont hyperactifs. Après une période prolongée d'abstinence, les systèmes neuronaux retournent à un état apparemment normal, mais avec respectivement une hyper- et une hyporéactivité résiduelle des systèmes du stress et de la récompense.

L'ensemble des phénomènes adaptatifs mis en jeu au cours de la consommation répétée de drogue aboutirait à une complète dérégulation de l'homéostasie hédonique qui serait à la base de la « spirale de l'addiction ». La consommation répétée de drogue, entrecoupée d'épisodes de sevrage, conduirait progressivement l'individu dans un nouvel état d'équilibre homéostatique – allostasie – qui se traduirait entre autre par une augmentation du point de consigne de l'homéostasie hédonique (seuil hédonique) ainsi que par une augmentation persistante de la motivation à expérimenter de nouveau les effets de la drogue (Ahmed & Koob, 1998; Ahmed *et al.*, 2000). Le processus de sensibilisation de l'activité du système dopaminergique mésolimbique impliquée dans l'« *incentive-sensitization* » ne serait qu'un exemple de cette dérégulation homéostatique, et jouerait un rôle majeur dans le développement du comportement addictif, la transition vers l'état de dépendance, ainsi que dans les processus liés à la rechute. De même, la diminution de la transmission dopaminergique observée au cours du syndrome de sevrage, qui est une conséquence commune aux différentes drogues d'abus (Acquas & Di Chiara, 1992; Rossetti *et al.*, 1992; Weiss *et al.*, 1992; Crippens & Robinson, 1994; Diana *et al.*, 1995; Weiss *et al.*, 1996; Diana *et al.*, 1999; Georges & Aston-Jones, 2003) représenterait une contre-adaptation importante du système. La dépression du système dopaminergique au cours du sevrage serait à l'origine de l'état de malaise précoce que ressentent les toxicomanes en manque de drogue et pourrait ainsi participer au maintien de la consommation de drogue (composante motivationnelle du sevrage), non seulement par un processus de renforcement négatif (la drogue est consommée pour éviter les effets aversifs du sevrage), mais également en participant à la modification du seuil hédonique.

III.2.4. Quel rôle pour la dopamine dans les processus addictifs ?

L'hypothèse de Koob & Le Moal suppose que la dérégulation du seuil hédonique est à la base du caractère compulsif du comportement de recherche de drogue, et place ainsi l'impact hédonique de la dopamine au cœur des processus motivationnels et de récompense, en postulant de façon explicite que les variations de la transmission dopaminergique peuvent sous-tendre des états affectifs positifs et négatifs qui motivent la consommation de drogue.

En revanche, la théorie de Robinson & Berridge postule que le plaisir subjectif procuré par la drogue (« *liking* ») n'est pas la composante de la récompense qui se sensibilise au cours du développement de l'addiction, et donc que l'aspect purement hédonique n'est pas le processus qui est médié par le système dopaminergique (pour revue : Berridge & Robinson, 1998). Au contraire, leur théorie propose que la dopamine serait engagée dans des processus plus complexes (nommés « *wanting* » ou « *incentive-saliency* ») qui permettent d'attribuer une « valeur affective particulière »

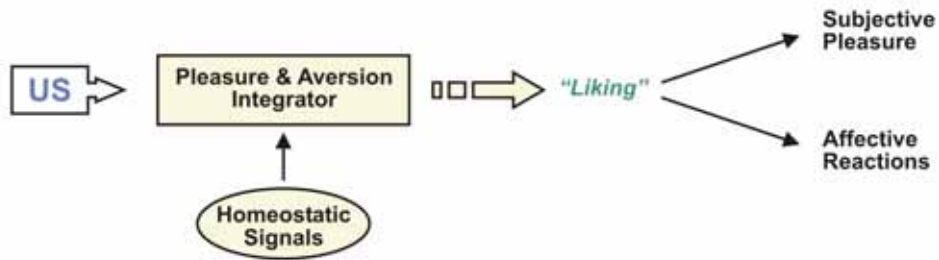
(« *saliency* ») à la drogue et/ou à des stimuli environnementaux qui lui sont associés. La sensibilisation du système dopaminergique rendrait ces stimuli de plus en plus attractifs et désirables (« *incentive* »). En d'autres termes, les processus psychologiques dénommés « *liking* » et « *wanting* » correspondent à deux composantes distinctes du phénomène de récompense, respectivement impliquées dans l'impact purement hédonique d'une récompense (ne fait pas intervenir le système dopaminergique), et dans l'attribution par le système dopaminergique d'une valeur affective attractive (« *incentive-saliency* ») aux stimuli associés à cette récompense⁴ (Figure 10).

Dans le cas de la dépendance aux opiacés, comme nous l'avons précédemment mentionné (cf. § II.2.2.a., ci-dessus), il apparaît clairement que les effets renforçants primaires de la morphine ou de l'héroïne (« *liking* » selon Robinson & Berridge) ne sont absolument pas médiés par le système dopaminergique mésolimbique (pour revues : Bardo, 1998; Bechara *et al.*, 1998; Shippenberg & Elmer, 1998; Van Ree *et al.*, 1999). En effet, des antagonistes dopaminergiques ainsi que la lésion à la 6-OHDA de l'innervation dopaminergique de l'Acb ne bloquent pas l'acquisition du comportement d'autoadministration d'opiacés (Ettenberg *et al.*, 1982; Pettit *et al.*, 1984; Dworkin *et al.*, 1988). De plus, d'autres travaux ont démontré que le système dopaminergique mésolimbique n'était ni nécessaire ni suffisant pour médier les processus de renforcement immédiat (Bechara *et al.*, 1992; Gerrits *et al.*, 1994; Gerrits & Van Ree, 1996; Nader & van der Kooy, 1997). L'ensemble de ces observations a amené Antoine Bechara, Karim Nader & Derek Van Der Kooy à formuler l'hypothèse de l'existence de deux systèmes motivationnels différents (« *The two separate motivational system hypothesis* »). Ces auteurs ont suggéré que la dopamine est capable de médier la récompense uniquement si l'individu est dans un état de manque (syndrome de sevrage), et qu'un autre substrat neurobiologique (le TPP, noyau tegmental pédonculopontin) sous-tend les processus de récompense lorsque l'individu n'est pas dépendant et en sevrage (Nader *et al.*, 1997; Bechara *et al.*, 1998). L'intérêt de cette hypothèse dans le cadre général de notre travail est qu'elle attribue un rôle important, si ce n'est primordial, au syndrome de sevrage et à son action sur le système dopaminergique mésolimbique, qui pourrait alors être impliqué dans le maintien de la consommation de drogue.

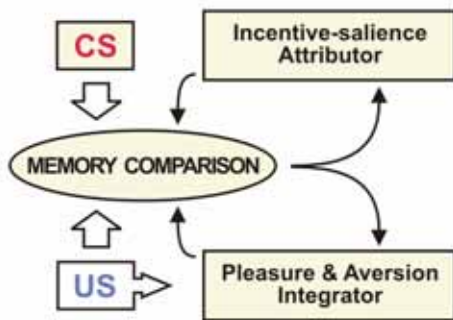
Si la dopamine a un rôle dans l'« *incentive-saliency* » et si l'hypothèse de Bechara, Nader & Van Der Kooy est vraie, cela signifie que la modification de l'activité du système dopaminergique au cours du syndrome de sevrage des opiacés pourrait représenter une étape critique pour l'attribution d'une valeur motivationnelle, incitative (« *incentive* »), à des stimuli environnementaux associés au sevrage. Ainsi, les stimuli présents dans l'entourage de l'individu au cours des périodes de sevrage spontané (qui sont fréquentes chez les toxicomanes entre deux prises de drogue), pourraient représenter un signal capable de motiver à lui seul la consommation de la drogue, la rendant attractive. En accord avec cette hypothèse, plusieurs études ont en effet suggéré que les stimuli environnementaux

⁴ Les termes anglo-saxons « *incentive-saliency* » et « *incentive-motivation* » se réfèrent à la capacité d'attribution d'une *valeur affective* particulière, *attractive* et *incitative* à des *stimuli environnementaux* associés à l'abus de drogue, et qui par la suite peuvent être capable d'*initier un comportement* particulier. Dans ce manuscrit, ces expressions ne seront pas constamment traduites en français car elles représentent des concepts difficiles à exprimer de manière simple dans notre langue.

PHASE ① - Hedonic Activation by New US



PHASE ② - Associative-learning (CS-US trace)



PHASE ③ - Incentive-salience to CS Next Time

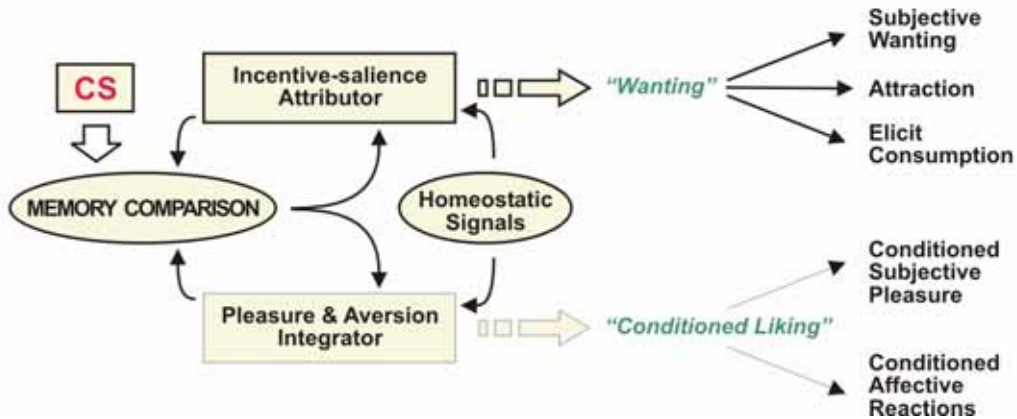


Figure 10. Processus d'acquisition de la récompense selon le modèle de l'« *incentive-salience* » (d'après Berridge & Robinson, 1998).

(Phase ①) La première fois que le plaisir hédonique (US, « *liking* ») est rencontré, il débute le processus « d'ébauche de la récompense », et active les phases ② et ③. Cependant, le « *liking* » par lui-même n'est pas suffisant pour motiver un comportement dirigé par des stimuli environnementaux. (Phase ②) Les systèmes de la mémoire associative permettent le transfert de l'impact hédonique (US) vers des stimuli environnementaux qui lui sont associés. Au départ, ces stimuli conditionnés n'ont qu'une faible capacité à activer les systèmes qui sous-tendent le « *liking* », mais les processus d'apprentissage associatif permettent de faire le lien entre ces divers événements. (Phase ③) Lorsque les stimuli conditionnés sont à nouveau rencontrés au cours de la consommation, l'activation du système dopaminergique mésolimbique permet de leur attribuer une valeur affective attractive (« *incentive-salience* ») via les systèmes d'apprentissage associatif. L'attribution d'« *incentive-salience* » aux stimuli conditionnés les rend attractifs, fait d'eux la cible du « *wanting* » et les rend capable de contrôler le comportement. De manière séparée, les stimuli conditionnés peuvent également activer le « *liking* ». Cependant, seul le « *wanting* » peut guider des comportements particuliers vers des stimuli conditionnés rendus attractifs par le processus d'« *incentive-salience* ».

associés au syndrome de sevrage des opiacés pouvaient potentialiser la valeur de récompense attribuée à la drogue elle-même dans le but de maintenir un comportement de recherche et de consommation de drogue (Ahmed *et al.*, 2000; Hutcheson *et al.*, 2001; Harris & Aston-Jones, 2003).

IV. EMOTIONS ET MOTIVATION : IMPLICATION DE L'« EXTENDED AMYGDALA »

IV.1. Amygdale et processus émotionnels

IV.1.1. Vue d'ensemble

L'émotion correspond à un état psychologique initié par une récompense (renforcement positif) ou une punition (renforcement négatif), ou par des variations de ces processus de renforcement (pour revue : Rolls, 2000). Les émotions permettent d'interagir de façon correcte avec l'environnement et de ce fait sont intimement liées à la survie de l'individu et à l'évolution des espèces. Se défendre, se nourrir, ou se reproduire, sont autant de comportements à forte connotation émotionnelle et inhérents au règne animal, qui sont nécessairement sous-tendus par les substrats neurobiologiques responsables de la motivation et des phénomènes de renforcement. Un des challenges de la recherche actuelle est de comprendre les processus neurobiologiques par lesquels un individu est capable de juger de la valeur d'un renforcement et/ou de se représenter la signification affective (émotionnelle) acquise par un stimulus donné de son environnement par des processus de conditionnement, afin d'engager une séquence comportementale adaptée et appropriée. Comme nous l'avons déjà mentionné (cf. § III.2., ci-dessus), la dérégulation de ces processus de renforcement induite par la consommation compulsive de drogues psychoactives joue un rôle fondamental dans le développement des conduites addictives. Ainsi, la compréhension des mécanismes neurobiologiques qui gouvernent les émotions et la motivation est d'un enjeu capital d'un point de vue thérapeutique pour les comportements addictifs, mais également dans de nombreuses pathologies neurologiques, telles que la dépression, la démence, ou encore la schizophrénie.

Depuis plus d'un siècle, les travaux de pionniers des Neurosciences tels que S. Brown & A. Schafer (1888) ou H. Klüver & P.C. Bucy (1937) ont permis de mettre en évidence le rôle majeur de l'amygdale dans la régulation des processus émotionnels (pour une revue complète des différentes fonctions de l'amygdale, consulter : Aggleton, 2000). Ces auteurs ont caractérisé un ensemble de désordres psychobiologiques suite à la destruction du lobe temporal (qui contient l'amygdale) chez le singe. Ces déficits – à présent regroupés sous le terme de « syndrome de Klüver-Bucy » et connus comme dépendant de l'intégrité de l'amygdale – sont caractérisés par une « cécité psychique », et incluent une absence de colère et de peur, une agnosie visuelle, et une activité orale et sexuelle exacerbée. Chez l'homme, des atteintes spécifiques bilatérales au niveau du complexe de l'amygdale sont extrêmement rares. Des lésions partielles de l'amygdale ne provoquent que rarement l'ensemble des caractéristiques du syndrome de Klüver-Bucy, mais génèrent cependant de nombreux désordres dans la perception et l'expression des émotions (Aggleton, 1993), qui incluent notamment une altération de la reconnaissance des expressions faciales de peur (Adolphs *et al.*, 1994; Young *et al.*,

1995; Adolphs *et al.*, 1998), et également des déficits d'apprentissage et de mémoire d'événements à forte connotation émotionnelle (Bechara *et al.*, 1995; Cahill, 2000). L'amygdale apparaît ainsi comme une structure clé pour la régulation des phénomènes liés aux émotions, et semble capable d'assurer des liaisons essentielles entre les processus qui donnent à l'expérience sensorielle sa signification émotionnelle.

IV.1.2. Neuroanatomie de l'amygdale

L'amygdale est constituée de divers noyaux qui sont regroupés en unités cytoarchitectoniques et fonctionnelles (pour revues : De Olmos *et al.*, 1985; Price *et al.*, 1987; Amaral *et al.*, 1992; Alheid *et al.*, 1995; McDonald *et al.*, 1999; Pitkanen, 2000). Deux de ces noyaux ont été particulièrement impliqués dans le contrôle des processus émotionnels : le noyau basolatéral (BIA) et le noyau central (CeA) de l'amygdale. Le BIA inclut les noyaux latéral, basal, et basal accessoire de l'amygdale, qui possèdent une structure très proche de celle du néocortex (Alheid *et al.*, 1995; Swanson & Petrovich, 1998; McDonald *et al.*, 1999). Ce noyau est fortement interconnecté avec de nombreuses régions corticales sensorielles et reçoit ainsi des afférences polymodales. Le BIA est également en étroite relation anatomique avec les aires corticales préfrontales et cingulaires, et avec l'hippocampe. En retour, le BIA projette sur le CeA et le striatum ventral. Le CeA en revanche possède une morphologie et une connectivité différentes, qui ressemblent à celle du striatum. Le CeA projette en majeure partie sur le BNST, l'hypothalamus ainsi que sur la formation réticulée du tronc cérébral (qui inclut l'ensemble des systèmes monoaminergiques centraux), via deux voies de connexions principales : ① le système amygdalofuge ventral qui est constitué d'un ensemble de fibres diffuses, et ② la strie terminale, constituée d'un faisceau de fibres plus compact.

La position anatomique de l'amygdale lui permet ainsi d'opérer des liaisons entre les aires corticales, qui traitent les informations sensorielles et attentionnelles, et les systèmes effecteurs de l'hypothalamus et du tronc cérébral. Cependant, la différenciation neuroanatomique flagrante qui existe entre ces deux noyaux permet de penser que le CeA pourrait être engagé dans des fonctions moins complexes et moins intégrées que le BIA.

IV.1.3. Apport des études sur le conditionnement des réponses émotionnelles

IV.1.3.a. Conditionnement aversif

La majeure partie des données expérimentales concernant le rôle des noyaux de l'amygdale dans les émotions provient d'études réalisées chez l'animal dans des situations de peur conditionnée (pour revues : Fendt & Fanselow, 1999; Le Doux, 2000; Maren, 2001). Le protocole expérimental classique utilisé dans ce genre d'étude consiste à associer de façon répétée l'application de chocs électriques légers sur les pattes d'un rat, à la présentation d'un stimulus simple (visuel ou olfactif). Par la suite, la simple réexposition de l'animal à ce stimulus conditionné provoquera la mise en place d'un comportement typique d'immobilisation, caractéristique d'un sentiment de peur (« *freezing* »). Ce type de conditionnement aversif est caractéristique d'un conditionnement de type Pavlovien, dans lequel un stimulus neutre (lumière, odeur, ou contexte environnemental ; CS) est associé avec un stimulus

inconditionné possédant une connotation émotionnelle négative (choc électrique ; US). La répétition des associations entre le CS et l'US permet le transfert de la valeur émotionnelle (aversive, dans ce cas) du stimulus inconditionné vers le CS, qui devient alors, à lui seul, capable d'induire une réponse conditionnée de l'animal (comme par exemple le « *freezing* »).

Les premières études ont montré que des lésions de l'amygdale perturbent le conditionnement de la peur chez le rongeur, quelle que soit la modalité du stimulus ou la réponse mesurée (Blanchard & Blanchard, 1972), mais également chez le singe et l'homme (Bechara *et al.*, 1995; La Bar *et al.*, 1995). Depuis, les nombreux travaux entrepris dans ce domaine laissent apparaître que les noyaux basolatéral (BIA) et central (CeA) de l'amygdale sont fondamentalement impliqués dans l'acquisition et l'expression de comportements liés à la peur, et ceci, de manière différentielle (pour revues : Le Doux, 2000; Gabriel *et al.*, 2003). Le consensus majeur émergeant de ces travaux stipule qu'au cours du conditionnement de la peur, des informations sensorielles incroyablement complexes en provenance de l'environnement et traitées par le néocortex, l'hippocampe et le thalamus, atteignent le BIA, qui représente le noyau qui permet de générer une association entre CS et US. Le BIA utilise ensuite ces informations pour contrôler l'activité des neurones de sortie du CeA. Le CeA, au contraire, agit comme un « contrôleur de la moelle épinière » via ses projections descendantes dirigées vers l'hypothalamus et les structures du tronc cérébral, et permet ainsi d'orchestrer des réponses autonomes et neuroendocrines, et d'organiser des séquences comportementales adaptées. Dans ce modèle, le transfert de l'information s'effectue selon un mode sériel entre le BIA et le CeA. En effet, si le noyau basolatéral de l'amygdale est détruit, le conditionnement de la peur ne peut plus s'effectuer, et dans ce cas, le noyau central de l'amygdale est incapable de médier les fonctions associatives (Nader & Le Doux, 1997).

IV.1.3.b. Conditionnement appétitif

Les travaux plus récents analysant les processus neurobiologiques impliqués dans le conditionnement appétitif ont suggéré que les fonctions du BIA pourraient être plus complexes que le simple contrôle des réponses autonomes et endocrines par l'intermédiaire du CeA (pour revues : Everitt *et al.*, 2000; Cardinal *et al.*, 2002). En effet, le noyau basolatéral de l'amygdale projette également sur le striatum ventral et le cortex préfrontal, lui permettant de pouvoir exercer une influence sur des comportements plus complexes (Everitt *et al.*, 1999; Everitt *et al.*, 2000). De plus, le CeA reçoit des afférences sensorielles directes (McDonald *et al.*, 1999; Pitkanen, 2000) et pourrait être capable de sous-tendre des processus d'apprentissage associatif de manière indépendante du BIA (Hatfield *et al.*, 1996; Hitchcott & Phillips, 1998; Everitt *et al.*, 2000; Parkinson *et al.*, 2000).

Ces études ont proposé, qu'en plus du mode sériel présenté ci-dessus, le flux des informations au sein de l'amygdale pourrait également être traité selon un mode parallèle, dans lequel les représentations mémorisées dans (ou transmises par) le BIA et le CeA pourraient affecter le comportement par l'intermédiaire de circuits neuronaux différents (ces phénomènes seront détaillés par la suite ; cf. § IV.2.2., ci-dessous).

IV.2. L'« *extended amygdala* » : à l'interface des émotions, de la motivation et des processus d'apprentissage associatifs

IV.2.1. Anatomie de l'« *extended amygdala* »

Le terme « *extended amygdala* » est généralement employé pour désigner un ensemble de structures limbiques sous-corticales du cerveau antérieur qui sont fortement interconnectées, et qui incluent certains des noyaux de l'amygdale et du BNST (pour revue : Alheid, 2003). La division centrale de l'« *extended amygdala* » est composée du noyau central de l'amygdale et de la partie latérale du BNST, alors que la division médiale de l'« *extended amygdala* » est composée du noyau médian de l'amygdale et de la partie médiale du BNST. Le noyau accumbens (Acb), et plus particulièrement sa partie médiale shell (AcbS), est en étroite relation avec ces structures, et il a été suggéré que cette région limbique pourrait représenter une extension antérieure de la division centrale de l'« *extended amygdala* » (Alheid & Heimer, 1988, 1996; Heimer *et al.*, 1997a; Heimer *et al.*, 1997b). De plus, l'activité des structures de l'« *extended amygdala* » est également modulée par des projections ascendantes de type dopaminergique et noradrénergique en provenance de la VTA et du NTS (Phelix *et al.*, 1992; Freedman & Cassell, 1994; Delfs *et al.*, 1998; Aston-Jones *et al.*, 1999a).

L'organisation anatomique et neurochimique de la division centrale de l'« *extended amygdala* », en relation avec ses connexions afférentes et efférentes, est représentée de manière non exhaustive sur la Figure 11. Les principales connexions afférentes aux structures de l'« *extended amygdala* » sont principalement de type glutamatergiques et d'origine corticales (pour revue : McDonald *et al.*, 1999). Les réponses du CeA sont également contrôlées par les neurones efférents glutamatergiques du noyau basolatéral de l'amygdale, notamment via un cluster d'interneurones inhibiteurs (ITC pour « *intercalated cell masses* ») (pour revues : Pitkanen *et al.*, 1997; Cassell *et al.*, 1999; Pare *et al.*, 2003; Pitkanen *et al.*, 2003). Les projections extrinsèques de l'« *extended amygdala* » connectent sur différents sites effecteurs comme par exemple les noyaux de l'hypothalamus, la PAG, ainsi que sur des noyaux autonomes du tronc cérébral et de la moelle épinière (Alheid & Heimer, 1988; Schmued, 1994). Plus particulièrement, le CeA projette également sur des noyaux monoaminergiques comme la VTA, la SNC, le LC, et les noyaux du raphé (Cardinal *et al.*, 2002).

L'architecture intrinsèque de la division centrale de l'« *extended amygdala* » est très particulière (Figure 11). La partie latérale du CeA (CeL) et la partie antérolatérale du BNST (BNSTal) contiennent en majorité des neurones de type GABAergiques possédant une morphologie similaire qui ressemble aux neurones épineux de taille moyenne du striatum (Sun & Cassell, 1993), et qui co-expriment divers neuropeptides, comme la Met-enképhaline ou le CRF (hormone corticotrope) (Veinante *et al.*, 1997). Les neurones GABAergiques du CeL et du BNSTal projettent sur des neurones principalement de type glutamatergiques situés dans la partie médiale du CeA (CeM) et dans la partie postérolatérale du BNST (BNSTpl). Ces neurones efférents glutamatergiques représentent les principales voies de sortie de la division centrale de l'« *extended amygdala* ».

Le noyau central de l'amygdale est « régionalisé » en trois sous-divisions : la partie capsulaire (CeC), la partie latérale (CeL) et la partie médiale (CeM). De manière intéressante, l'architecture des

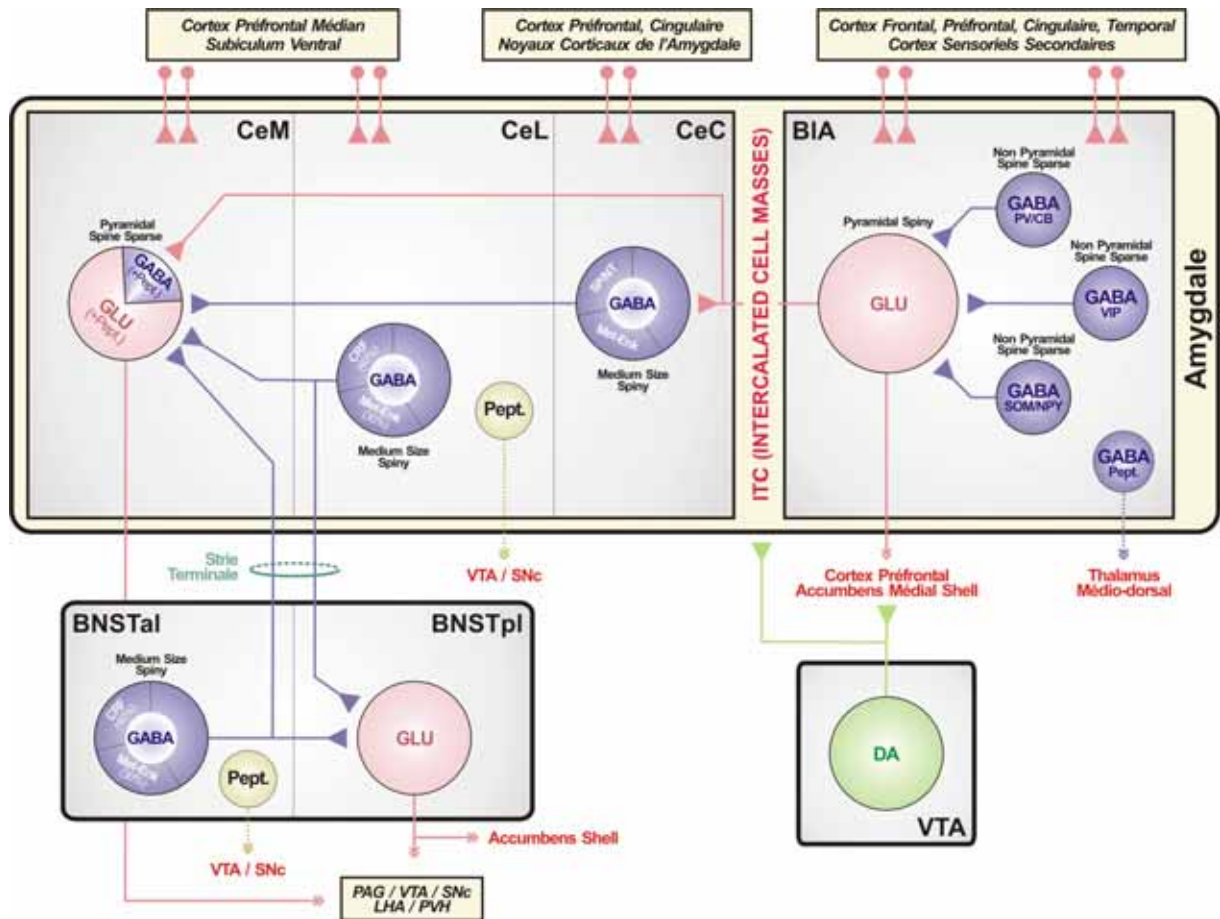


Figure 11. Représentation schématique des connexions intrinsèques et extrinsèques de la division centrale de l'« *extended amygdala* », et de son organisation neurochimique.

La taille des cercles correspond à la proportion de chaque population neuronale dans un noyau donné. Les voies excitatrices sont représentées en rose, et les voies inhibitrices en bleu. La plupart des neurones GABAergiques du BIA, du CeC, du CeL et du BNSTal co-expriment divers marqueurs (peptides et protéines capables de lier le calcium) qui les différencient. Les principales afférences de l'« *extended amygdala* » (composé du CeA et du BNST) proviennent de diverses aires corticales et du BIA. Les projections efférentes de l'« *extended amygdala* » connectent principalement sur la PAG, la VTA, la SNc, la LHA et le PVH. La VTA module l'activité des différents noyaux de l'amygdale via des projections dopaminergiques. Le noyau accumbens est fortement interconnecté avec l'ensemble de ces structures. BIA, noyau basolatéral de l'amygdale ; CeC, noyau central de l'amygdale partie capsulaire ; CeL, noyau central de l'amygdale partie latérale ; CeM, noyau central de l'amygdale partie médiale ; BNSTal, noyau du lit de la strie terminale partie antérolatérale ; BNSTpl, noyau du lit de la strie terminale partie postérolatérale ; VTA, aire tegmentale ventrale ; SNc, substance noire *pars compacta* ; GABA, acide γ -aminobutyrique ; GLU, glutamate ; DA, dopamine ; Pept., neuropeptides ; SP, substance P ; Met-Enk, Met-enképhaline ; NT, neurotensine ; NPY, neuropeptide Y ; SOM, somatostatine ; VIP, peptide vasoactif intestinal ; CRF, hormone corticotrope ; CB, calbindine ; PV, parvalbumine.

différentes sous-divisions du CeA, en terme de connexions et de marqueurs neurochimiques, semble très similaire à l'organisation de la boucle striato-pallidale ventrale (Figure 12) : le CeC s'apparente à la partie shell de l'Acb ; le CeL, à la partie core de l'Acb ; et le CeM, au pallidum ventral (pour revue : Cassell *et al.*, 1999). Les neurones GABAergiques du CeC et du CeL qui contiennent également la neurotensine et/ou les enképhalines projettent sur le CeM. De plus, comme pour le complexe striatal, les afférences glutamatergiques en provenance du cortex (et probablement du BIA) contactent de manière asymétrique les neurones GABAergiques du CeA principalement au niveau des épines dendritiques (Sun *et al.*, 1994). En ce qui concerne l'innervation dopaminergique des structures de l'« *extended amygdala* », les caractéristiques ultrastructurales sont similaires à celles du striatum, puisque les terminaisons dopaminergiques forment des synapses symétriques sur les dendrites et les épines dendritiques des neurones GABAergiques (Asan, 1997).

Le noyau basolatéral de l'amygdale (BIA) ne fait pas partie à proprement parler des structures de l'« *extended amygdala* ». Cependant, ce noyau est directement relié et de manière unidirectionnelle au CeA et à l'AcbS via des projections efférentes glutamatergiques (pour revues : Pitkanen *et al.*, 1997; Pitkanen *et al.*, 2003). D'un point de vue anatomique, le BIA est une structure qui ressemble au cortex, dans laquelle des interneurons inhibiteurs GABAergiques contrôlent l'activité de neurones excitateurs efférents de type glutamatergiques (Figure 11) (McDonald, 1985a, 1992, 1996). Les neurones glutamatergiques présentent une morphologie de type pyramidale, et sont les principaux constituants du BIA (McDonald, 1992). Les interneurons GABAergiques, qui ne sont pas de type pyramidal et qui présentent très peu d'épines dendritiques (McDonald, 1985b), sont relativement peu nombreux au sein du BIA et peuvent être différenciés par les différents marqueurs qu'ils expriment, comme des protéines capables de lier le calcium (parvalbumine et calbindine) ou divers neuropeptides (somatostatine, cholestykinine, VIP et NPY) (McDonald, 1989; McDonald & Betette, 2001).

Ainsi, d'un point de vue structural, l'organisation du BIA (structure « quasi-corticale » afférente à l'« *extended amygdala* ») est extrêmement différente de celle des structures de l'« *extended amygdala* » (qui incluent le CeA et le BNST, dont l'organisation anatomique est proche de celle du striatum). L'amygdale n'est donc pas une structure homogène, ni d'un point de vue anatomique, ni d'un point de vue fonctionnel (Swanson & Petrovich, 1998). Ainsi, il semble impératif d'intégrer ces différences lors de l'étude de l'implication des différents noyaux de l'amygdale dans la régulation de diverses fonctions physiologiques et/ou psychobiologiques.

IV.2.2. Implications fonctionnelles : rôle du BIA, du CeA et de l'Acb dans les processus émotionnels et motivationnels

L'organisation anatomique de l'« *extended amygdala* » et de l'ensemble des structures qui lui sont associées suggère que ce macrosystème, situé à l'interface entre des régions cérébrales limbiques et motrices, pourrait contrôler de nombreuses fonctions, telles que les émotions (valeur affective), la motivation, et les processus d'apprentissage associatifs, qui sont mises en jeu de manière critique dans les processus conduisant à l'addiction. En effet, de nombreuses études utilisant des marqueurs d'activité neuronale comme par exemple c-Fos, ont montré que, de manière générale, les structures

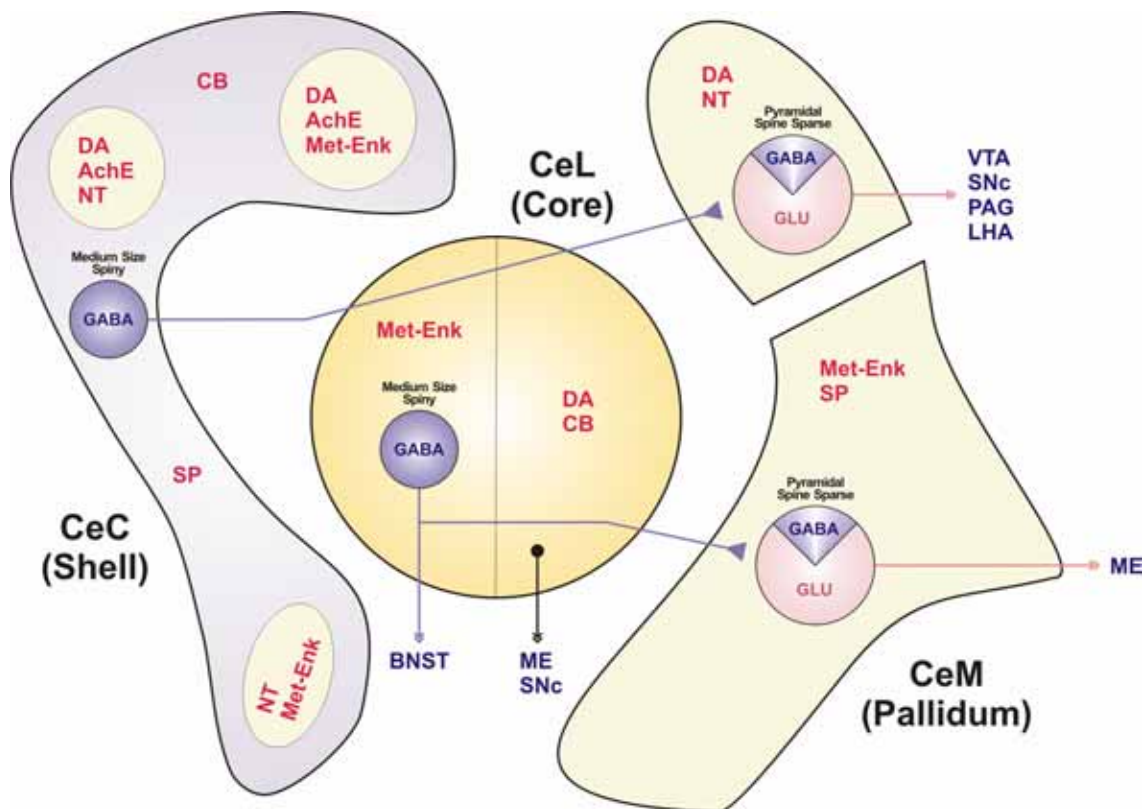


Figure 12. Diagramme schématisique représentant l'organisation de type « shell/core/pallidum » des différentes sous-divisions du CeA (d'après Cassell *et al.*, 1999).

Les marqueurs entourés d'un cercle dans le CeC sont exprimés selon une distribution en îlot de type « patch ». CeC, noyau central de l'amygdale partie capsulaire ; CeL, noyau central de l'amygdale partie latérale ; CeM, noyau central de l'amygdale partie médiale ; BNST, noyau du lit de la strie terminale ; SNc, substance noire *pars compacta* ; VTA, aire tegmentale ventrale ; PAG, substance grise périaqueductale ; LHA, aire hypothalamique latérale ; ME, moelle épinière ; GABA, acide γ -aminobutyrique ; GLU, glutamate ; DA, dopamine ; SP, substance P ; Met-Enk, Met-enképhaline ; NT, neurotensine ; CB, calbindine ; AChE, acétylcholinestérase.

de l'« *extended amygdala* », ainsi que les régions cérébrales qui lui sont associées sont recrutées dans diverses situations inconditionnées et/ou conditionnées impliquant des processus émotionnels et motivationnels, qu'elles soient aversives (Pezzone *et al.*, 1992; Sandner *et al.*, 1993; Beckmann *et al.*, 1995; Carr *et al.*, 1999; Georges *et al.*, 2000; Dayas *et al.*, 2001; Hall *et al.*, 2001c), ou bien appétitives (Brown *et al.*, 1992; Franklin & Druhan, 2000; Schroeder *et al.*, 2000)

De nombreuses données de la littérature sont disponibles concernant le rôle des différents noyaux de l'amygdale (CeA et BIA) ou du noyau accumbens (Acb) dans l'ensemble de ces processus, et notamment sur les phénomènes d'apprentissages associatifs mettant en jeu des renforçateurs naturels comme par exemple la nourriture. En revanche, bien que le BNST ait été impliqué dans certains phénomènes aversifs (Davis & Shi, 1999), et en particulier dans le sevrage des opiacés (pour revue : Aston-Jones *et al.*, 1999a), son implication fonctionnelle dans les processus d'apprentissage reste encore à définir.

IV.2.2.a. Rôle du noyau basolatéral de l'amygdale

Le noyau basolatéral de l'amygdale apparaît comme une structure indispensable pour qu'un stimulus conditionné puisse accéder à la signification affective et motivationnelle du stimulus inconditionné qu'il prédit de manière spécifique (pour revue : Everitt *et al.*, 2003). En effet, bien que des rats lésés au niveau du BIA soient capables d'acquies certaines formes de conditionnement, les réponses conditionnées de ces animaux lésés ne sont pas affectées par la valeur du stimulus inconditionné. Par exemple, des rats lésés au niveau du BIA peuvent présenter une réponse normale lors d'un conditionnement dans lequel un CS est associé avec de la nourriture (la réponse conditionnée étant l'orientation et l'approche vers la mangeoire) (Hatfield *et al.*, 1996). En revanche, si les propriétés renforçantes de la nourriture sont par la suite dévaluées (par association répétée avec un stimulus fortement aversif comme le lithium), ces animaux deviennent alors incapables d'ajuster leur réponse lors de la présentation du CS initial, et continuent malgré tout à exprimer un comportement d'orientation vers la mangeoire (Hatfield *et al.*, 1996). Chez ces animaux lésés au niveau du BIA, le stimulus conditionné semble être directement associé à la réponse inconditionnée (association de type stimulus/réponse), et semble n'avoir acquis aucune information quant à la valeur affective de l'US. Des résultats similaires ont été obtenus chez des singes rhésus (Malkova *et al.*, 1997).

Chez le rat, la lésion spécifique du BIA bloque également la capacité d'un CS à agir comme un renforçateur pour l'acquisition d'un conditionnement de deuxième ordre⁵ (Hatfield *et al.*, 1996). Ces animaux lésés perdent ainsi la capacité d'accéder à la valeur affective acquise par le CS, et d'utiliser cette représentation pour diriger leur comportement. Récemment, les effets de la lésion du BIA sur le conditionnement de deuxième ordre ont été analysés de manière plus détaillée (Setlow *et al.*, 2002a). L'expérience a consisté à examiner l'effet de la lésion du BIA réalisée après un conditionnement de premier ordre (au moment où un CS acquiert une valeur émotionnelle et motivationnelle), mais avant le conditionnement de deuxième ordre, qui permet de tester la signification motivationnelle acquise

⁵ Dans ce type de conditionnement, un premier stimulus (CS₁) est associé avec un US possédant une valeur renforçante, et un second stimulus (CS₂) est par la suite associé avec le CS₁. Le CS₂ est ainsi associé à la valeur affective qui est rappelée par le CS₁, plutôt qu'à ses propres propriétés sensorielles (pour revue : Gewirtz & Davis, 1998).

par le CS. Les rats lésés après que la valeur renforçante de l'US ait été transférée vers le CS sont capables d'acquérir un conditionnement de deuxième ordre (Setlow *et al.*, 2002a). L'ensemble de ces résultats indique que le BIA est une structure essentielle pour qu'un CS puisse acquérir une valeur renforçante attractive et incitative (motivationnelle) par l'intermédiaire de processus d'apprentissages associatifs Pavloviens. Cependant, le maintien et l'utilisation de cette valeur affective déjà mémorisée pour la formation d'associations de deuxième ordre ne semblent pas dépendre de l'intégrité du BIA (Malkova *et al.*, 1997; Setlow *et al.*, 2002a).

Dans les procédures de renforcement conditionné, un stimulus à l'origine neutre (CS), qui est associé de manière répétée avec un stimulus inconditionné possédant des propriétés renforçantes propres (US), acquiert une telle valeur affective et motivationnelle, que l'animal « travaillera » pour l'obtenir (processus par lequel un stimulus conditionné agit comme un renforçateur positif qui permet de guider une action instrumentale). Ce type de comportement implique un choix opérant de l'animal qui dépend de la valeur affective que prédit le CS. Ce phénomène peut être analysé dans des modèles d'autoadministration intraveineuse de drogue, dans lesquels un CS, précédemment associé de façon contingente aux effets renforçants de l'injection d'une drogue d'abus (en général, la cocaïne ou l'amphétamine), est capable de contrôler le comportement de recherche de drogue de l'animal. Dans ce genre de protocole, il a été montré que des animaux lésés au niveau du BIA sont incapables d'acquérir un comportement de recherche de drogue contrôlé par un stimulus conditionné (Whitelaw *et al.*, 1996; Meil & See, 1997; Grimm & See, 2000). En revanche, la lésion du BIA n'a pas d'effet sur l'activation de la réponse locomotrice induite par la cocaïne (Whitelaw *et al.*, 1996). L'ensemble de ces données suggère l'existence d'une dissociation entre les mécanismes neurobiologiques impliqués dans les propriétés renforçantes immédiates de la cocaïne (indépendants du BIA), et les processus qui sous-tendent les propriétés motivationnelles des stimuli associés aux effets de la drogue (dépendants du BIA). En accord avec cette interprétation, Schulteis *et al.* (2000) ont montré que la lésion du BIA n'affecte pas les effets aversifs primaires du sevrage des opiacés, mais en revanche qu'elle bloque la formation d'associations entre l'état affectif négatif généré par le sevrage et des stimuli environnementaux à l'origine neutres.

IV.2.2.b. Rôle du noyau central de l'amygdale

Le CeA est connecté à de nombreuses régions cérébrales, qui contrôlent les réponses autonomes et motrices impliquées dans les conditionnements aversifs (Davis *et al.*, 1994), et qui incluent, entre autre, la substance grise périaqueducatale (qui sous-tend la réponse de « freezing »), l'hypothalamus (à la base de l'activation du système sympathique) et les divers noyaux monoaminergiques centraux. Ainsi, de par sa position anatomique, le CeA est généralement vu comme le noyau de l'amygdale qui est capable de contrôler un grand nombre de réponses inconditionnées ou conditionnées associées à la peur. En effet, de nombreuses études ont montré que la lésion du CeA bloque l'expression de la réponse de peur conditionnée (« freezing »), alors que la stimulation électrique de ce noyau est capable d'évoquer des réponses similaires à la réponse de peur conditionnée, même en l'absence de conditionnement (pour revue : Sah *et al.*, 2003). De plus, le CeA semble également jouer un rôle

majeur dans le contrôle des aspects attentionnels du traitement des informations associées aux stimuli (Gallagher & Holland, 1994; Holland *et al.*, 2000), probablement via ses projections dirigées vers le noyau basal de Meynert (Han *et al.*, 1999).

Le CeA, contrairement au BIA, ne semble pas impliqué dans le conditionnement de deuxième ordre et les processus de renforcement conditionné (Hatfield *et al.*, 1996; Robledo *et al.*, 1996). En effet, des rats lésés au niveau du CeA sont capables d'exprimer certaines réponses conditionnées appétitives (Gallagher *et al.*, 1990), qui sont sensibles à la dévaluation du renforcement (Hatfield *et al.*, 1996). Ces données impliquent que le CeA n'est pas nécessaire pour qu'un CS puisse accéder à la signification affective et motivationnelle de l'US qu'il prédit (pour revue : Everitt *et al.*, 2003). En revanche, l'intégrité du CeA (contrairement au BIA) apparaît comme nécessaire au conditionnement de type stimulus/réponse permettant d'associer de manière « innée » un CS à un US possédant une valeur renforçante naturelle (Gallagher *et al.*, 1990; Hatfield *et al.*, 1996; Parkinson *et al.*, 2000). Les réponses conditionnées associées à ces conditionnements « sensorimoteurs » (orientation vers un stimulus) pourraient en partie dépendre des projections du CeA vers les noyaux dopaminergiques (Han *et al.*, 1997; Everitt *et al.*, 1999). Ces résultats montrent l'existence d'une dissociation fonctionnelle entre l'implication du BIA et du CeA dans les processus de conditionnement mettant en jeu des renforcements positifs naturels (nourriture).

Ce genre de dissociation a également été observé dans des procédures de conditionnement opérant faisant appel à un renforçateur négatif (Killcross *et al.*, 1997). Les résultats de cette étude montrent que la présentation d'un CS possédant une connotation aversive (son associé à des chocs électriques légers) induit la suppression d'une réponse opérante (appui de l'animal sur un levier pour obtenir de la nourriture) chez des rats normaux. Ce type de comportement (nommé « *conditioned suppression* ») semble « inné » et représente un index de la formation d'associations Pavloviennes entre CS et US. De manière intéressante, simultanément à cette réponse conditionnée « innée », les animaux modifient leur comportement et se mettent à répondre sur le levier non renforcé, ce qui implique un choix opérant de l'animal qui dépend de la valeur affective prédite par le CS. Cet effet nommé « *conditioned punishment* » montre que ces animaux sont capables d'accéder à la valeur affective et motivationnelle acquise par le CS, et ainsi de modifier en conséquence leur comportement de manière opérante. La lésion excitotoxique bilatérale du BIA ne modifie absolument pas l'effet de « *conditioned suppression* », mais affecte fortement le phénomène de « *conditioned suppression* ». Au contraire, la lésion du CeA provoque l'effet inverse (Killcross *et al.*, 1997).

IV.2.2.c. Rôle du noyau accumbens

Le noyau accumbens (Acb) fait partie de la boucle striato-pallido-thalamo-corticale (Alexander & Crutcher, 1990), mais reçoit également de nombreuses informations en provenance de diverses structures limbiques, qui incluent le BIA, l'hippocampe et le cortex préfrontal. Les principales voies efférentes de l'Acb projettent sur diverses structures cérébrales, connues pour leur capacité à réguler l'expression du comportement. Ainsi, il a été suggéré que l'Acb pourrait représenter une interface entre système limbique et système moteur (pour revue : Mogenson *et al.*, 1980). D'un point de vue

anatomique et neurochimique, l'Acb peut être sous-divisé en une partie core (AcbC) et une partie shell (AcbS) et le pattern de projection de ces deux noyaux diffère : l'AcbC ressemble au striatum dorsal et projette majoritairement sur le pallidum ventral, alors que l'AcbS projette en plus sur différents sites effecteurs comme l'hypothalamus et la PAG, et ainsi s'apparente plus aux structures de l'« *extended amygdala* ». Comme mentionné précédemment, l'innervation dopaminergique de l'Acb joue un rôle critique dans les propriétés motivationnelles des drogues d'abus et des stimuli qui leur sont associées, et participe ainsi à l'addiction (pour revue : Berridge & Robinson, 1998).

Les propriétés motivationnelles des stimuli possédant une forte connotation affective semblent en partie médiées par le noyau accumbens (pour revue : Cardinal *et al.*, 2002). En effet, des lésions du BIA et de l'Acb seuls ou des lésions déconnectant fonctionnellement le BIA de l'Acb chez le rat sont capables de supprimer l'expression de la préférence de place conditionnée (Everitt *et al.*, 1991). En accord avec ces données, une étude récente a également montré que la déconnexion BIA/Acb perturbe l'acquisition d'un conditionnement de deuxième ordre (Setlow *et al.*, 2002b), qui dépend de la capacité d'un CS à acquérir une valeur motivationnelle par association avec un US possédant une valeur renforçante (processus connu pour dépendre de l'intégrité du BIA – Hatfield *et al.*, 1996). Ces résultats suggèrent que le noyau accumbens pourrait permettre l'expression comportementale des informations associatives en provenance du BIA.

Chez le rat, bien que la lésion de la partie core de l'Acb supprime complètement la réponse conditionnée d'orientation vers un stimulus conditionné (conditionnement de type stimulus/réponse), la capacité d'utiliser la valeur affective du CS pour guider une réponse instrumentale n'est affectée ni par la lésion de l'AcbC et de l'AcbS (Parkinson *et al.*, 1999), ni par la lésion à la 6-OHDA de l'innervation dopaminergique de l'Acb (Taylor & Robbins, 1986). Ces résultats suggèrent que l'Acb est impliqué dans l'expression de certaines réponses conditionnées, mais n'est pas lui-même une région dans laquelle l'association se crée. En revanche, d'autres travaux ont montré que l'administration systémique d'amphétamine ou bien l'injection d'agonistes dopaminergiques directement au niveau du noyau accumbens potentialisent la réponse de l'animal dans des protocoles de renforcement conditionné (pour revue : Cador *et al.*, 1991a), et que ce phénomène dépend de l'intégrité de l'AcbS (Parkinson *et al.*, 1999), de l'innervation dopaminergique de l'Acb (Taylor & Robbins, 1986; Cador *et al.*, 1991b; Wolterink *et al.*, 1993), et du CeA (Robledo *et al.*, 1996). L'ensemble de ces données suggère que l'information concernant la valeur motivationnelle d'un CS dépend du BIA, et qu'elle est ensuite transférée vers l'Acb, dans lequel ses propriétés pourraient être potentialisées par des mécanismes mettant en jeu la transmission dopaminergique.

IV.2.2.d. Conclusions sur les interactions BIA/CeA/Acb dans les processus émotionnels et motivationnels

En conclusion, il semble que le BIA soit une structure absolument nécessaire à la mémorisation des associations Pavloviennes qui permettent au CS de retrouver la valeur affective et motivationnelle de l'US qu'il prédit. Ces informations peuvent ainsi être utilisées pour contrôler les réponses du CeA et de ses cibles anatomiques (hypothalamus, structures du tronc cérébral, formation réticulée), ce qui permet l'émergence de réponses émotionnelles conditionnées – comme par exemple le « *freezing* » –

et la modulation de l'éveil comportemental et des processus attentionnels. En plus de sa capacité à utiliser les informations en provenance du BIA, le CeA reçoit également des afférences sensorielles en provenance du néocortex, et pourrait de ce fait encoder directement certaines formes d'associations Pavloviennes (conditionnement de type stimulus/réponse), qui sont indépendantes de la signification affective du stimulus, et qui pourraient permettre d'organiser l'expression de réponses conditionnées spécifiques (orientation vers un CS). Le BIA semble également capable d'utiliser les informations acquises pour moduler des réponses plus complexes, probablement par ses projections directes vers le noyau accumbens. En effet, l'Acb est une structure clé qui permet d'organiser et de générer un comportement adapté en relation avec les propriétés motivationnelles des stimuli conditionnés. Ces interactions anatomiques et fonctionnelles sont illustrées de manière simplifiée sur la Figure 13.

IV.2.3. Implication des interactions amygdale/accumbens dans l'addiction

Les interactions qui existent entre les différents noyaux de l'amygdale et le noyau accumbens pour le contrôle des processus émotionnels et motivationnels sont extrêmement importantes dans le cadre de l'addiction. Il est évident que le comportement compulsif de prise de drogue et la forte vulnérabilité à la rechute qui caractérisent les conduites addictives impliquent une dérégulation des processus qui gouvernent les émotions, la motivation et la mémoire affective. En effet, les drogues d'abus induisent une sensibilisation comportementale (processus par lequel l'administration répétée de drogue aboutit à une augmentation de ses effets comportementaux – pour revues : Robinson & Berridge, 1993; Altman *et al.*, 1996; Kalivas *et al.*, 1998; Robinson & Berridge, 2000), corrélée à une potentialisation de la libération de dopamine dans l'Acb (Kalivas & Stewart, 1991).

La sensibilisation aux effets des psychostimulants provoque une hypersensibilité du noyau accumbens à la stimulation dopaminergique (Cador *et al.*, 1995). Il est clair que, lors de la consommation abusive de drogue, les processus motivationnels sous-tendus par l'Acb et le système dopaminergique mésolimbique issu de la VTA, nommés « *incentive-saliency* » ou « *wanting* », se sensibilisent (Robinson & Berridge, 1993, 2000). Ainsi, les propriétés motivationnelles des stimuli environnementaux associés à l'abus de drogue pourraient être fortement et anormalement potentialisés (Stewart & Badiani, 1993; Schenk & Partridge, 1997) et contribuer à la perte de contrôle sur la consommation de drogue et à la vulnérabilité à la rechute (De Vries *et al.*, 1998; De Vries *et al.*, 1999; Deroche *et al.*, 1999).

Des études utilisant des modèles animaux d'autoadministration intraveineuse de cocaïne ont montré que le BIA est une structure nécessaire au phénomène de réinstallation d'un comportement de recherche de drogue induit par la présentation de stimuli associés à la consommation de la drogue (Meil & See, 1997; Grimm & See, 2000). Ces données sont en accord avec les études précédemment décrites, et indiquent que l'activité du BIA est nécessaire pour qu'un CS puisse accéder à la valeur affective et motivationnelle de l'US qu'il prédit. De plus, la transmission glutamatergique au niveau de l'Acb a été récemment impliquée dans les effets motivationnels des stimuli conditionnés associés à la consommation de drogue (Cornish *et al.*, 1999; Cornish & Kalivas, 2000; Hotsenpiller *et al.*, 2001). Il a été notamment suggéré que la stimulation des récepteurs AMPA et NMDA des neurones de l'Acb

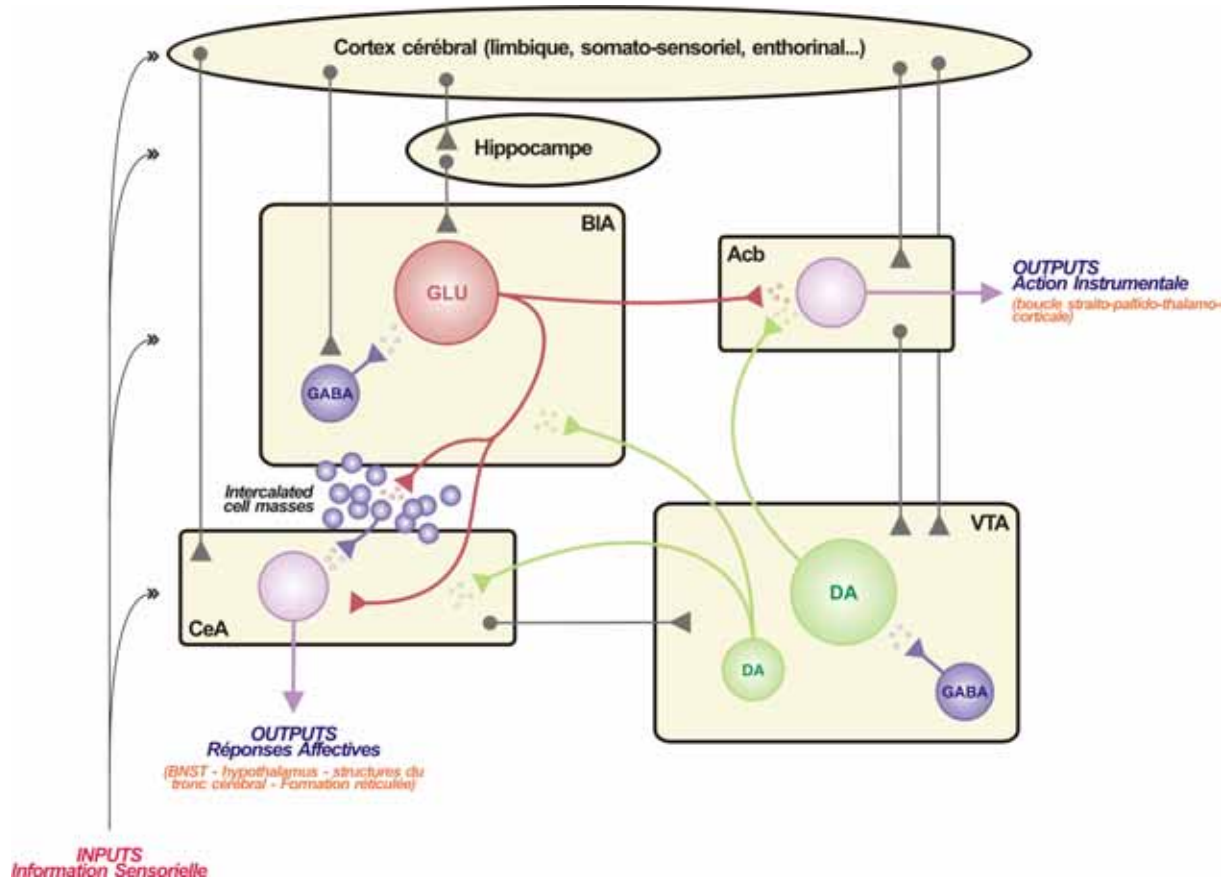


Figure 13. Représentation schématique simplifiée des relations fonctionnelles entre les noyaux de l'amygdale (BIA et CeA) et le noyau accumbens pour le traitement des informations émotionnelles et motivationnelles (d'après Cardinal *et al.*, 2002).

Dans le conditionnement de type Pavlovien, le BIA permet de générer des associations entre CS et US et par la suite utilise les informations sensorielles portées par un CS pour retrouver la valeur émotionnelle et motivationnelle de l'US qu'il prédit. Il peut utiliser ces informations pour influencer des comportements instrumentaux (via l'Acb) dans lesquels l'animal est amené à faire un choix, mais peut également l'expression de réponses conditionnées simples par l'intermédiaire du CeA. L'activité du CeA contrôle des systèmes neuroendocriniens et autonomes, mais peut également influencer l'éveil comportemental et les processus attentionnels via ses projections vers la formation réticulée. Le CeA est également impliqué dans la formation d'associations simples (conditionnement de type stimulus-réponse), et ceci, indépendamment du BIA. De plus, le CeA joue probablement un rôle important dans la régulation du contrôle dopaminergique de la boucle limbique striato-pallido-thalamo-corticale, impliquant l'Acb. L'Acb permet l'expression des propriétés motivationnelles des stimuli conditionnés qui ont acquis une forte connotation affective, en organisant et générant des comportements motivés et adaptés ; un effet, qui est probablement amplifié par l'innervation dopaminergique de l'Acb. Acb, noyau accumbens ; CeA, noyau central de l'amygdale ; BIA, noyau basolatéral de l'amygdale ; BNST, noyau du lit de la strie terminale ; VTA, aire tegmentale ventrale ; GABA, acide γ-aminobutyrique ; GLU, glutamate ; DA, dopamine.

pourrait à elle seule précipiter la réinstallation d'un comportement de recherche compulsive de drogue, et que des effets liés à l'activité des systèmes dopaminergique et glutamatergique dans l'Acb seraient impliqués dans le maintien du comportement de consommation de drogue (pour revue : Cornish & Kalivas, 2001).

Les neurones glutamatergiques du BIA projettent directement au niveau de l'Acb (Kelley *et al.*, 1982; McDonald, 1991; Wright *et al.*, 1996; Pitkanen, 2000). De plus, de nombreuses données d'électrophysiologie ont montré que le BIA est une structure dans laquelle des phénomènes de plasticité synaptique (comme la potentialisation à long terme) se mettent en place au cours du conditionnement Pavlovien (pour revue : Davis *et al.*, 1994; Maren, 1999; Schafe *et al.*, 2001; Maren, 2003). Ainsi, la présentation de stimuli précédemment associés à l'abus de drogue, et possédant une signification affective et motivationnelle (« *incentive-saliency* »), pourrait réactiver des neurones glutamatergiques efférents du BIA potentialisés lors du conditionnement, qui seraient à leur tour capables de modifier l'activité des neurones de l'Acb et ainsi de générer un comportement de recherche de drogue.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

MATÉRIEL & MÉTHODES

I. CHOIX METHODOLOGIQUES

Comme mentionné dans l'Introduction Générale, ce travail a pour but de mieux caractériser les propriétés motivationnelles du syndrome de sevrage des opiacés, et comporte deux objectifs principaux : ① déterminer les circuits neuronaux qui sont impliqués dans les composantes motivationnelle et somatique du sevrage des opiacés précipité par la naloxone (cf. Chapitre 1), ce qui constitue l'analyse des aspects inconditionnés du sevrage, et ② déterminer si l'aspect motivationnel révélé par le conditionnement des effets aversifs du sevrage des opiacés (effets conditionnés) met en jeu les mêmes substrats neurobiologiques que ceux impliqués dans le sevrage inconditionné (cf. Chapitre 2), ce qui constitue l'analyse des aspects conditionnés du sevrage.

Pour cela, notre démarche expérimentale a consisté à combiner des modèles comportementaux permettant d'évaluer les propriétés affectives aversives et motivationnelles du syndrome de sevrage – aussi bien sur le versant inconditionné que conditionné – avec des approches de neuroanatomie fonctionnelle (hybridation *in situ*) permettant de rechercher les substrats neurobiologiques impliqués dans ces phénomènes comportementaux en « traçant » les circuits neuronaux recrutés à l'aide d'un marqueur de réactivité neuronale : le proto-oncogène *c-fos*.

∞∞∞∞

La stimulation d'un neurone par un stimulus donné peut activer deux mécanismes de signalisation différents : ① l'activité électrophysiologique, qui traite et transmet l'information portée par le stimulus de façon quasi immédiate, et ② les cascades de seconds messagers intracellulaires, qui mettent en jeu de façon rapide et transitoire la synthèse protéique de facteurs de transcription⁶ (pour revues : Hughes & Dragunow, 1995; Herdegen & Leah, 1998). Ces facteurs de transcriptions inductibles permettront par la suite d'initier la transcription et/ou la répression d'autres gènes codant pour diverses protéines (récepteurs, canaux ioniques, structure du cytosquelette, enzymes nécessaires à la synthèse ou au recyclage des neurotransmetteurs, etc...). Les « gènes d'activation précoces » (IEGs) permettent ainsi de modifier la réponse et/ou la plasticité neuronale à plus ou moins long terme. L'analyse de la régulation de l'expression des IEGs par divers stimuli permet donc de comprendre comment les différents systèmes de seconds messagers modifient le fonctionnement du système nerveux, mais permet également de « tracer » les circuits neuronaux recrutés par ces stimuli, d'un point de vue purement anatomique (Kovacs, 1998). Cependant, la relation causale entre expression des produits du gène *c-fos* et activité de décharge électrique neuronale n'a pas encore été établie de manière claire et objective, même s'il pourrait exister une très bonne corrélation dans certaines

⁶ Dans ce manuscrit, les facteurs de transcription inductibles sont aussi appelés « gènes d'activation précoces », ou bien « *immediate-early genes* » (IEGs), selon la terminologie anglo-saxonne.

conditions expérimentales et dans certaines populations neuronales au sein de structures cérébrales variées (cf. § III.3., Chapitre 1).

Dans le système nerveux central, il existe de nombreux facteurs de transcription inductibles qui ont été regroupés par famille (*Fos*, *Jun* ou *Krox*). Cependant, ce sont les produits du gène *c-fos* qui ont été le plus largement utilisés pour la visualisation *in situ* de structures cérébrales activées en réponse à diverses stimulations aiguës. La famille *Fos* comporte quatre protéines majeures (*c-Fos*, *FosB*, *Fra-1* et *Fra-2*), codées par des gènes comportant quatre exons et trois introns (pour revues : Herdegen & Leah, 1998; Kovacs, 1998). Le gène *c-fos* code pour une protéine de 55 kDa (*c-Fos*) qui est induite de façon rapide par des stimulations aiguës ($\frac{1}{2}$ vie : 2 hr) : l'activation de l'ARNm *c-fos* est transitoire et atteint un pic entre 30 et 60 min après une stimulation aiguë, alors que le taux maximal de protéine *c-Fos* est observé entre 1 et 3 hr. Le gène *fosB* code pour une protéine de 46/48 kDa (*FosB*), mais possède également un variant d'épissage nommé $\Delta fosB$ qui code pour des protéines de 35 et 37 kDa (*Fra-1* et *Fra-2*). *Fra-1* et *Fra-2* sont induits par des stimuli répétés chroniques et s'accumulent dans la cellule ($\frac{1}{2}$ vies respectives : 28 et 208 hr). Ces protéines ont été impliquées dans les changements phénotypiques à long terme induits par des stimulations répétées, chroniques et toniques, ainsi que dans la plasticité neuronale et comportementale (Pennypacker *et al.*, 1995; Nestler *et al.*, 1999).

RÉSUMÉ

Dans l'ensemble de notre étude, nous avons utilisé le proto-oncogène *c-fos* comme marqueur de réactivité neuronale, et nous avons analysé l'expression de son ARNm dans nos différentes situations expérimentales par hybridation *in situ* en simple et double marquage (sonde *c-fos* radioactive et une autre sonde marquée à la digoxygénine). La méthode d'hybridation *in situ* radioactive nous permet de pouvoir quantifier l'expression de *c-fos* à un niveau anatomique (densitométrie au niveau de diverses structures cérébrales) et cellulaire (quantification du nombre de neurones marqués dans une région donnée et/ou quantification des niveaux d'expression d'ARNm par neurones), et ceci dans des neurones phénotypiquement identifiés par des marqueurs des neurotransmetteurs qu'ils expriment. De plus, notre protocole d'hybridation *in situ* est optimisé pour une sensibilité de détection accrue, ce qui nous permet dans le cas du proto-oncogène *c-fos*, de détecter un niveau d'expression basal mesurable et de pouvoir quantifier d'éventuelles diminutions d'expression de son ARNm.

II. ANIMAUX ET TRAITEMENTS

II.1. Conditions d'élevage des animaux

Des rats mâles de souche Sprague-Dawley (IFFA-CREDO, Lyon, France) pesant entre 180 et 200 g au début des expériences ont été utilisés. Les animaux sont assignés de manière aléatoire à des cages collectives (4 rats par cages), et placés dans une animalerie thermorégulée (22°C) soumise à

un cycle lumière/obscurité de 12 hr/12 hr (lumière de 08.00 hr à 20.00 hr). Toutes les expériences ont été réalisées pendant la phase lumineuse. Tous les animaux ont disposé de nourriture standard et d'eau de boisson *ad libitum*, et ont été manipulés de manière extensive pendant une dizaine de jours avant le début des expériences. Les procédures chirurgicales et expérimentales ont été réalisées en accord avec les Directives du Conseil de la Communauté Européenne du 24 novembre 1986 (86/609/EEC), et avec l'approbation du Centre National de la Recherche Scientifique.

II.2. Induction de la dépendance à la morphine et du syndrome de sevrage

La dépendance à la morphine a été induite par l'implantation sous-cutanée de 2 pastilles à libération lente contenant chacune 75 mg de morphine base (NIDA, « *National Institute on Drug Abuse* », USA). Les pastilles sont implantées sous la peau du dos à environ 1 cm de la ligne médiane, à hauteur de la dernière vertèbre thoracique. Cette intervention n'excède pas 1 minute et est réalisée sous une légère anesthésie par inhalation d'un mélange halothane/O₂ (induction, 4/100 v/v pendant 10 sec, suivi de 1/100 v/v pendant 30 sec). L'état de dépendance est obtenu dans les 24 hr qui suivent l'implantation des pastilles de morphine et se maintient constant pendant 15 jours (Gold *et al.*, 1994).

Pour toutes les expériences, le syndrome de sevrage des opiacés a toujours été précipité 6 jours après l'implantation des pastilles de morphine, par l'injection sous-cutanée de naloxone hydrochloride (RBI/Sigma-Aldrich, France) dissoute dans une solution saline isotonique (NaCl 9‰). Dans notre étude, nous avons utilisé 4 doses de naloxone base (1 mg de naloxone base = 1.113 mg de naloxone hydrochloride) pour précipiter le syndrome de sevrage des opiacés : 7.5, 15, 30 ou 120 µg/kg.

III. PROTOCOLE DE L'AVERSION DE PLACE CONDITIONNEE (PAC)

Le conditionnement des effets aversifs du syndrome de sevrage des opiacés s'effectue dans un dispositif composé de trois compartiments rectangulaires (A, B, et C – 40 x 33 x 34 cm), arrangés de façon radiale (120°) et accessibles à partir d'un compartiment central triangulaire (Figure 14). Les trois compartiments A, B, et C, sont différenciés par la texture du sol ainsi que par un motif géométrique disposé sur le sol et les murs. Les déplacements de l'animal sont enregistrés automatiquement par 5 cellules photoélectriques disposés à 3.5 cm au dessus du sol au bas des parois les plus longues de chaque compartiment (espacées de 8.5 cm chacune). Ces cellules photoélectriques sont reliées à un ordinateur qui comptabilise le temps que l'animal passe dans chacun des trois compartiments A, B, et C. Quatre de ces labyrinthes en Y (« *Y-maze* ») sont placés dans une pièce sombre à température constante (22°C), en présence d'un bruit blanc (75 dB) qui permet de masquer les bruits extérieurs, et sont illuminés par une lumière rouge de faible puissance (15 W) située au-dessus de chaque dispositif. Le protocole expérimental comporte 3 phases distinctes : la phase de pré-conditionnement, la phase de conditionnement, et la phase de test.

① Lors du pré-conditionnement (J4, 4 jours après l'implantation des pastilles de morphine), les rats morphino-dépendants sont placés dans le compartiment central triangulaire et autorisés à explorer librement le dispositif pendant 20 min (1200 sec). A l'issue de cette phase, les animaux

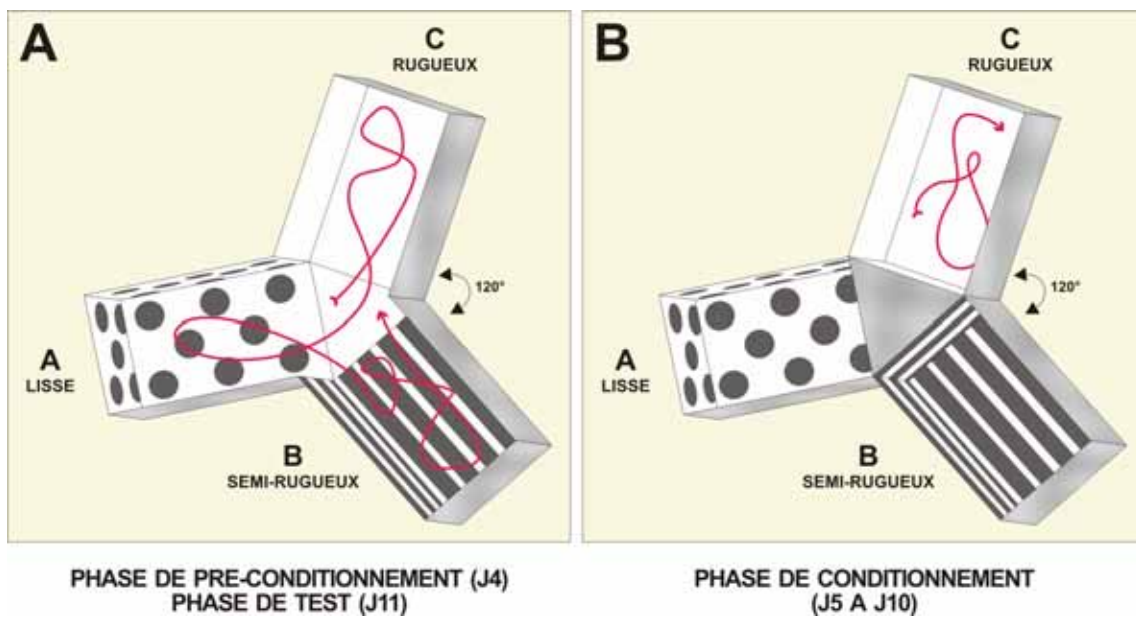


Figure 14. Dispositif expérimental utilisé pour le conditionnement des effets aversifs du syndrome de sevrage des opiacés.

(A) Lors du pré-conditionnement (J4, 4 jours après l'implantation des pastilles de morphine) et de la phase de test (J11), les animaux sont placés dans le compartiment central triangulaire et autorisés à explorer librement le dispositif expérimental. Les déplacements de l'animal sont enregistrés par des cellules photoélectriques disposés au bas des parois de chaque compartiment, et un ordinateur comptabilise le temps que l'animal passe dans chacun des trois compartiments A, B, et C. (B) Lors du conditionnement, les animaux reçoivent une injection de saline les jours 5, 7, et 9 qui suivent l'implantation des pastilles de morphine, avant d'être confinés dans le compartiment assigné au saline (cs-). Alternativement, les jours 6, 8 et 10 qui suivent l'implantation, les rats reçoivent une injection de naloxone avant d'être confinés dans l'environnement assigné à la naloxone (cs+). Les compartiments cs+ et cs- sont randomisés entre les rats.

montrant soit une aversion spontanée (moins de 17% du temps de la session, i.e. 200 sec) soit une préférence spontanée (plus de 48% du temps de la session, i.e. 580 sec) pour un des compartiments A, B, ou C sont éliminés de l'expérience. Ensuite, pour chaque rat, les deux compartiments pour lesquels la valeur du temps d'exploration est la plus proche sont choisis, et assignés de façon aléatoire, l'un à une injection de saline (cs-) et l'autre à une injection de naloxone (cs+). Après assignation des compartiments, une analyse de variance non paramétrique (« *Friedman test* ») suivie d'un test *post hoc* (« *Dunn's multiple comparison test* ») permet de vérifier qu'il n'existe aucune différence significative entre les compartiments cs+ et cs-, ce qui pourrait constituer un biais important. Les rats sont ensuite répartis dans les divers groupes expérimentaux. Cette phase de pré-conditionnement permet ainsi d'obtenir 3 variables : D_0 (temps passé dans le compartiment qui sera associé à la naloxone, cs+), S_0 (temps passé dans le compartiment qui sera associé au saline, cs-), et N_0 (temps passé dans le compartiment neutre).

② Lors du conditionnement (J5 à J10), les animaux reçoivent une injection de saline les jours 5, 7, et 9 qui suivent l'implantation des pastilles de morphine, avant d'être confinés pendant 20 min dans l'environnement assigné au saline (cs-). Alternativement, les jours 6, 8 et 10 qui suivent l'implantation, les rats reçoivent une injection de naloxone avant d'être confinés dans l'environnement assigné à la naloxone (cs+) pendant 20 min.

③ Le test comportemental se déroule à J11 (24 h après la dernière session de conditionnement) et consiste en une exploration libre du dispositif expérimental par les animaux pendant 20 min. Ceci permet d'obtenir 3 nouvelles variables : D (temps passé dans le compartiment cs+), S (temps passé dans le compartiment cs-), et N (temps passé dans le compartiment neutre). L'évaluation du score d'aversion de place conditionnée correspond à la différence entre le temps passé par l'animal dans le même compartiment, lors du test et lors du pré-conditionnement ($D-D_0$, $S-S_0$, et $N-N_0$). Ces données sont analysées pour chaque compartiment grâce à un t-test apparié non paramétrique (« *Wilcoxon matched pairs test* ») qui compare la différence de temps passé dans un compartiment donné avant et après le conditionnement.

IV. PROTOCOLES EXPERIMENTAUX ET ORGANISATION DES GROUPES D'ANIMAUX

IV.1. Etude des effets inconditionnés du sevrage (cf. Chapitre 1)

Cette étude a pour but de « tracer » les circuits neurobiologiques qui sous-tendent les composantes motivationnelle et somatique du syndrome de sevrage des opiacés précipité de façon aigu par des doses croissantes de naloxone. En effet, d'un point de vue comportemental, ces deux composantes s'expriment de manière différentielle en fonction de la dose de naloxone utilisée pour précipiter le sevrage (Schulteis *et al.*, 1994). Nous avons donc utilisé 5 groupes de rats implantés avec 2 pastilles de morphine (2 x 75 mg), qui se différencient par la dose de naloxone qu'ils ont reçue en injection sous-cutanée 6 jours après l'implantation des pastilles de morphine, afin de précipiter un syndrome de sevrage aigu : 0 (groupe contrôle, $n = 5$), 7.5 ($n = 6$), 15 ($n = 6$), 30 ($n = 6$) et 120 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($n = 6$). Les

animaux ont été sacrifiés par décapitation 60 min après les injections. Les cerveaux ont été rapidement disséqués, congelés dans des vapeurs d'azote liquide, sans fixation préalable, puis conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

Les doses de naloxone utilisées dans cette étude ont été choisies sur la base d'une analyse globale de données comportementales brutes déjà obtenues dans notre laboratoire concernant le syndrome de sevrage des opiacés (Caillé *et al.*, 1999; Caillé *et al.*, 2002; S. Caillé & L. Stinus, données non publiées), dans le but de déterminer les valeurs de DE₅₀ pour l'aversion de place conditionnée induite par la naloxone chez des animaux morphino-dépendants, ainsi que pour divers signes somatiques du sevrage. Ces valeurs de DE₅₀ (dose efficace permettant d'obtenir 50% de l'effet maximal) représentent une estimation quantitative de la sensibilité à la naloxone de ces différents signes comportementaux et permettent d'extraire les doses de naloxone les plus pertinentes pour discriminer entre les composantes motivationnelle et somatique du syndrome de sevrage. Cette analyse globale a été conduite en utilisant les données d'un total de 1154 rats mâles de souche Sprague-Dawley. Chez ces animaux rendus morphino-dépendant, une analyse ethopharmacologique du syndrome de sevrage précipité de manière aiguë par l'injection de différentes doses de naloxone (0, 10, 15, 50, 100 et 1000 µg/kg) a été réalisée comme décrit précédemment (Espejo *et al.*, 1995). Les signes somatiques suivants ont été quantifiés : « *body shake* » (ébrouements), « *mastication* » (mâchonnements), « *writhing* » (torsions abdominales), « *vocalization* » (vocalisations au toucher), « *weight loss* » (perte de poids), « *jumping* » (sauts), « *diarrhea* » (diarrhées), et « *salivation* » (salivation). Les données brutes obtenues pour chacun des signes physiques du sevrage en relation avec les doses de naloxone ont été moyennées (\pm SEM) et normalisées pour la dose qui produit l'effet maximal (i.e. 100 µg/kg). Les moyennes normalisées ont ensuite été exprimées en fonction du logarithme décimal des doses de naloxone, et des courbes de régression non linéaires ajustées aux moyennes normalisées ont été réalisées grâce au logiciel Prism 3.0 (GraphPad Software, San Diego, USA), permettant la détermination des valeurs de DE₅₀. De façon similaire, nous avons ré-analysé les données brutes obtenues lors de diverses expériences d'aversion de place conditionnée induite par la naloxone (0, 1.8, 3.75, 7.5, 15, 30 et 120 µg/kg), afin de déterminer la valeur de DE₅₀ pour cet indice de la composante motivationnelle du sevrage des opiacés.

De plus, afin de vérifier que les doses de naloxone choisies pour cette étude (7.5, 15, 30 et 120 µg/kg) ne sont pas aversives par elles-mêmes chez des animaux naïfs, nous avons évalué la capacité de doses croissantes de naloxone à induire une aversion de place conditionnée chez des rats mâles de souche Sprague-Dawley implantés avec des pastilles de placebo (NIDA, « *National Institute on Drug Abuse* », USA). Les doses de naloxone suivantes ont été utilisées : 0 (groupe contrôle, $n = 16$), 7.5 ($n = 8$), 15 ($n = 8$), 30 ($n = 8$), 120 ($n = 8$), 240 ($n = 10$) et 1000 µg/kg ($n = 10$).

IV.2. Etude des effets conditionnés du sevrage (cf. Chapitre 2)

L'objectif de cette étude est de déterminer si l'aspect motivationnel révélé par le conditionnement des effets aversifs du sevrage des opiacés met en jeu les mêmes substrats neurobiologiques que ceux impliqués dans le sevrage inconditionné. Pour cela nous avons comparé les circuits neuronaux

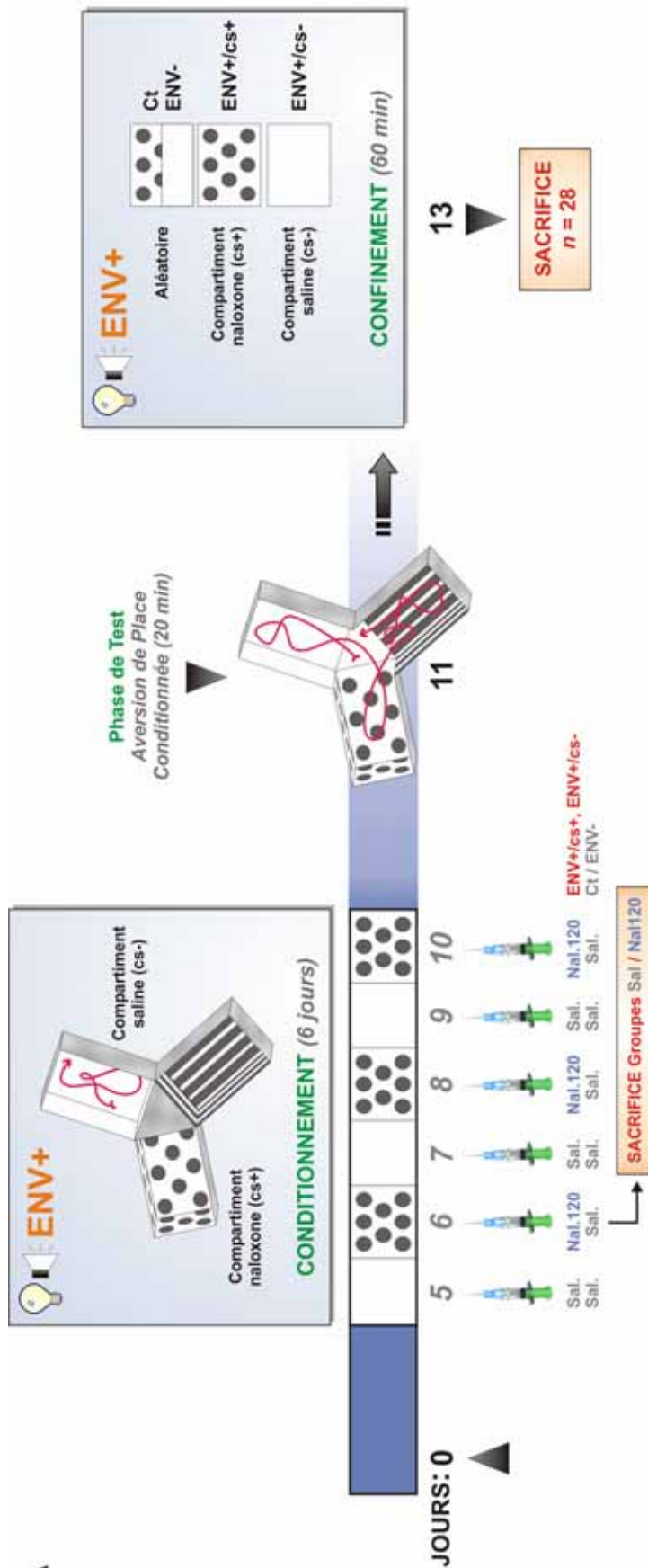
recrutés lors de la réexposition à des stimuli environnementaux associés précédemment au syndrome de sevrage (effets conditionnés), avec les structures recrutées par le syndrome de sevrage précipité de façon aiguë par la naloxone (effets inconditionnés).

Pour l'analyse des effets de la réexposition aux stimuli environnementaux associés au sevrage sur l'expression de *c-fos*, 4 groupes d'animaux morphino-dépendants ont été utilisés (Figure 15). Les stimuli environnementaux distaux (ENV) et proximaux (cs) associés au sevrage ont variés pour ces différents groupes de rats : ENV+/cs+ ($n = 8$), ENV+/cs- ($n = 8$), ENV- ($n = 6$) et Ct (groupe contrôle, $n = 6$) (une description détaillée des traitements que subissent ces animaux est fournie dans le tableau de la Figure 15B).

Pendant la phase de conditionnement (3 sessions), les rats des groupes ENV+/cs+ et ENV+/cs- ont été traités de la même manière. En effet, ces animaux ont été conditionnés à un compartiment spécifique du « *Y-maze* » (dans la pièce du PAC, ENV+), puisque le sevrage précipité par la naloxone (120 µg/kg) a été associé de façon répétée avec un compartiment du « *Y-maze* » (stimuli proximaux, cs+) les jours pairs (6, 8 et 10), alors qu'un autre compartiment a été associé à une injection de saline (stimuli proximaux, cs-) de façon alternée, les jours impairs (5, 7 et 9). En parallèle, un autre groupe de rats (ENV-) a reçu une injection de saline dans 2 des compartiments du « *Y-maze* », mais a expérimenté le sevrage précipité par la naloxone (120 µg/kg) dans un contexte différent (animalerie), alors que les animaux ENV+/cs+ et ENV+/cs- ont reçu du saline dans ce contexte « animalerie ». Un groupe contrôle (Ct) a reçu une injection de saline dans 2 des compartiments du « *Y-maze* », ainsi que dans leur cages d'élevage à l'animalerie. Tous les groupes ont dès lors été égaux en terme de nombre d'expositions aux différents environnements et de nombre d'injections reçues. Le jour 11 après l'implantation des pastilles, les scores d'aversion de place ont été mesurés comme décrit précédemment. Le jour 13 après l'implantation des pastilles (72 hr après la dernière session de conditionnement), tous les rats ont été confinés dans un compartiment spécifique du « *Y-maze* » pendant 60 min avant d'être sacrifiés par décapitation : les animaux Ct et ENV- ont été confinés de façon aléatoire dans un des compartiments associés au saline, alors que les rats ENV+/cs+ et ENV+/cs- ont été réexposés dans les compartiment associés respectivement à la naloxone (cs+) et au saline (cs-). Cette procédure permet de tester l'influence relative de deux groupes de stimuli environnementaux sur l'expression de *c-fos* : effet des stimuli distaux (comparaison entre les groupes ENV+/cs+ ou ENV+/cs- et le groupe ENV-) versus effet des stimuli proximaux (comparaison entre les groupes ENV+/cs+ et ENV+/cs-).

Pour comparer les réponses *c-fos* conditionnées avec les effets inconditionnés du syndrome de sevrage précipité par la naloxone, 2 autres groupes de rats morphino-dépendants ont été utilisés (Figure 15A) : Nal120 ($n = 8$) et Sal (groupe contrôle, $n = 8$). Ces animaux ont été manipulés et traités exactement dans les mêmes conditions que les rats conditionnés jusqu'au jour de la première injection de naloxone (i.e. jour 6 après l'implantation des pastilles). En effet, ces animaux ont vécu la phase de pré-conditionnement (J4) et une injection de saline dans un compartiment du « *Y-maze* » à J5. Le syndrome de sevrage a été ensuite précipité par injection sous-cutanée de naloxone (120 µg/kg) à J6 pour le groupe Nal120, alors que les rats du groupe Sal ont reçu une injection de saline. Après les

A



B

Groupes d'animaux Morphino-dépendants	PHASE DE CONDITIONNEMENT		PHASE DE TEST (comportement)		CONFINEMENT (c-fos)	
	Pièce du PAC (ENV+)		Animalerie (ENV-)		Pièce du PAC (ENV+)	
Ct	Compartiment naloxone (cs-) Jours 5 / 7 / 9	Compartiment naloxone (cs+) Jours 6 / 8 / 10	Cage d'élevage Jours 6 / 8 / 10 (soir)	Exploration libre du labyrinthe en Y	Aléatoire	Aléatoire
	Saline	Saline	Saline		Compartiment saline (cs-)	Compartiment naloxone (cs+)
ENV-	Saline	Saline	Naloxone, 120 µg/kg			
ENV+/cs+	Saline	Naloxone, 120 µg/kg	Saline			
ENV+/cs-	Saline	Naloxone, 120 µg/kg	Saline			

Figure 15. Étude des effets de la réexposition à des stimuli environnementaux associés au sevrage des opiacés : protocole expérimental et organisation des groupes d'animaux.

(A) Design expérimental pour l'étude des aspects conditionnés du sevrage (les traitements dans l'animalerie ne sont pas représentés). Voir le texte pour les explications (§ IV.2., Matériel & Méthodes). (B) Description des groupes d'animaux conditionnés aux effets aversifs du syndrome de sevrage conditionné. Ct : groupe contrôle (pas de sevrage). ENV- : groupe de rats pour qui le syndrome de sevrage est associé *négativement* avec la pièce du PAC pendant la phase de conditionnement ; au contraire le sevrage a été précipité avec 120 µg/kg de naloxone dans leurs cages d'élevage à l'animalerie (jours 6, 8 et 10 après l'implantation des pastilles, le soir). ENV+/cs+ et ENV+/cs- : groupes de rats pour qui le sevrage précipité par la naloxone (120 µg/kg) a été associé *positivement* avec la pièce du PAC (environnement dans lequel s'est effectué le conditionnement) pendant la phase de conditionnement, les jours 6, 8 et 10. Le jour 11 après l'implantation des pastilles de morphine, tous les rats sont autorisés à explorer librement le « Y-maze » pendant 20 min, permettant de mesurer les scores d'aversion de place conditionnés pour chacun des compartiments (test comportemental). Le jour 13 après l'implantation des pastilles, les animaux sont re-exposés à l'environnement du conditionnement (ENV+, pièce du PAC) pendant 60 min dans un compartiment spécifique du « Y-maze » (cs+ ou cs-) en fonction de leur appartenance aux différents groupes (pour l'analyse anatomo-fonctionnelle de c-fos). Voir le texte pour plus d'explications (§ IV.2., Matériel & Méthodes).

injections, les animaux ont été confinés pendant 60 min dans un compartiment du « Y-maze » avant d'être sacrifiés par décapitation.

V. HYBRIDATION *IN SITU* QUANTITATIVE (SONDES ARNC)

Toutes les expériences d'anatomie fonctionnelle pour l'étude de l'expression de l'ARNm du marqueur de réactivité neuronale *c-fos* ont été réalisées sur du tissu frais non perfusé. Pour cela, les animaux sont décapités sans anesthésie à l'aide d'une guillotine (60 min après les différents traitements), puis immédiatement après le sacrifice, les cerveaux sont rapidement disséqués puis congelés directement dans des vapeurs d'azote liquide, sans fixation préalable. Les pièces sont conservées à -80°C, puis débitées au cryostat en coupes sériées transversales de 12 µm d'épaisseur et récupérées sur des lames gélatinées. Les lames sont ensuite stockées à -80°C jusqu'à utilisation.

Dans nos diverses situations expérimentales, nous avons étudié la topographie de l'expression de *c-fos* par hybridation *in situ* en simple marquage dans pratiquement l'ensemble du cerveau. Pour certaines structures (VTA et amygdale) nous avons également réalisé des expériences de double marquage pour l'étude approfondie des populations neuronales recrutées.

V.1. Hybridation *in situ* en simple marquage

V.1.1. Marquage des sondes ARNC à l'UTP- $\alpha^{35}\text{S}$ par transcription *in vitro* (ARN- ^{35}S)

La détection de l'ARNm codant pour *c-fos* est effectuée par hybridation *in situ* avec une sonde ARNC antisens simple brin marquée par l'incorporation de nucléotides contenant un isotope radioactif (UTP- $\alpha^{35}\text{S}$, activité spécifique 1000 Ci/mmol ; Perkin Elmer Life Sciences, France) lors de la transcription *in vitro* par la RNA polymérase SP6 (Roche Diagnostics, France) de l'ADNC *c-fos* de rat contenu dans le plasmide pSP65 (séquence codante de 2.1 kb) (Curran *et al.*, 1987). 50 à 100 ng de plasmide linéarisé servent de matrice pour la transcription qui est réalisée grâce au protocole suivant :

Plasmide linéarisé (100 à 200 ng/µL)	0.5 µL (soit 50 à 100 ng)
Tampon de l'enzyme 5x	2 µL
rNTPs (CTP, GTP, ATP) 5 mM	1 µL
UTP 0.1 mM	0.5 µL
DTT (Dithiothreitol) 0.2 M	0.5 µL
UTP- $\alpha^{35}\text{S}$ (activité spécifique 1000 Ci/mmol)	3 µL
H ₂ O DEPC	1 µL
RNAsine (Promega, France)	0.5 µL
SP6 RNA Polymérase (Roche Diagnostics, France)	0.5 µL

Le mélange est incubé à 37°C pendant 1.5 hr (0.5 µL de RNA polymérase est rajouté en cours d'incubation). A la fin de la transcription, le plasmide est digéré par 1 µL de DNase-RNase free et les RNAses sont inhibées par 1 µL de RNAsine. Le mélange est incubé 15 min à 37°C. La sonde est ensuite dénaturée 5 min à 65°C afin d'éviter les auto-appariements. La réaction est arrêtée par 1 µL d'EDTA 250 mM, puis 1 µL d'ARNt (10 µg/µL) est ajouté.

Afin de permettre une meilleure pénétration de la sonde dans les tissus, les transcrits sont ramenés à une taille de 0.25 kb en moyenne par hydrolyse alcaline. Le volume réactionnel est complété à 50 µL avec de l'eau DEPC, puis 50 µL de solution d'hydrolyse A (DTT 10 mM, NaHCO₃ 0.08 M, Na₂CO₃ 0.12 M) sont ajoutés, et le mélange est incubé à 60°C. Le temps d'hydrolyse est calculé selon la formule suivante :

$$\tau_{(\text{min})} = \frac{l_0 - l_f}{k \times l_0 \times l_f}$$

l_0 : longueur initiale (kb)
 l_f : longueur finale (0.25 kb)
 k : 0.11 scission/kb/min

A titre d'exemple, le temps d'hydrolyse est de 32 min pour *c-fos* (2.1 kb). A la fin de l'hydrolyse, la réaction est neutralisée à 4°C par 50 µL de solution neutralisante B (DTT 10 mM, acétate de sodium 0.2 M, acide acétique 1%).

La sonde est ensuite purifiée sur colonne de chromatographie (gel Sephadex G50). Les éluats contenant la sonde marquée sont homogénéisés. Connaissant la radioactivité totale et celle du pic d'incorporation, le rendement de la réaction peut être calculé. La sonde marquée est ensuite précipitée dans une solution d'acétate de sodium 3 M/éthanol absolu (0.1/2.5 v/v) pH 5.0 pendant au moins une nuit à -20°C. Après centrifugation (1 à 2 hr, 10000 g), les culots sont séchés à la pompe à vide puis repris dans 24 µL total de Tris-EDTA 1x/DTT 50 mM. La sonde ainsi marquée est conservée à -20°C jusqu'à hybridation.

V.1.2. Protocole d'hybridation : simple marquage

Après décongélation, les coupes sont post-fixées dans du paraformaldéhyde 4% (PFA) pendant 5 min afin d'éviter le décollement de tissu, rincées dans 2 bains de SSC 4x et placées dans du SSC 4x/triethanolamine 0.1 M pH 8.0 pendant 10 min à température ambiante ; 0.25% d'anhydride acétique est ajouté pour les dernières 5 min. Après déshydratation dans des concentrations croissantes d'éthanol (70%, 80%, 95%, 100%), les coupes sont hybridées entre lame et lamelle pendant une nuit à 55°C en chambre humidifiée avec du SSC 4x, avec 10⁶ cpm de sonde antisens *c-fos* marquée à l'UTP-α³⁵S dans 50 µL de tampon d'hybridation (20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 300 mM NaCl, 50% formamide, 10% sulfate de dextran, 1% Denhardt) selon le protocole suivant :

Sonde (10 ⁶ cpm/lame)	x µL
RAM (100 µg/mL d'ADN de sperme de saumon, 400 µg/mL d'ARNt)	2 µL
H ₂ O DEPC	Qsp 6 µL
<i>Le mélange est passé 5 min à 65°C, puis 1 min dans la glace</i>	
Tampon d'hybridation	42 µL
DTT 5 M	1 µL
Thiosulfate de sodium 10%	0.5 µL
SDS 10%	0.5 µL

Les lames sont ensuite rincées dans du SSC 4x/DTT 1 mM (3 fois 5 min), puis traitées par un bain de SSC 4x/DTT 1 mM contenant 20 µg/mL de RNase A (20 min, 37°C) (Roche Diagnostics, France). Les coupes sont ensuite rincées dans des bains de SSC 2x/DTT 1 mM (10 min), SSC 1x/DTT 1 mM (5 min) et de SSC 0.5x/DTT 1 mM (5 min), à température ambiante. Elles sont ensuite placées dans 2 bains de SSC 0.1x/DTT 1 mM à 65°C pendant 30 min, puis refroidies dans du SSC 0.1x/DTT 1 mM à

température ambiante pendant environ 15 min. Les coupes sont enfin déshydratées dans des concentrations croissantes d'éthanol (70%, 80%, 95%, 100%), puis séchées à l'air libre.

Pour la détection du signal radioactif, les lames hybridées sont trempées à l'obscurité dans une émulsion photographique à 40°C (Ilford K5 diluée au tiers dans du SSC 1x), séchées verticalement pendant une nuit, puis exposées au contact d'un film rayon X Biomax MR (Kodak) pendant 1 mois pour l'analyse macroautoradiographique. Pour l'analyse microautoradiographique, après 3 mois d'exposition à l'obscurité, les coupes sont développées en chambre noire dans un bain de révélateur à 20°C pendant 5 min (p-méthylaminophénol 10 mM, hydroquinone 80 mM, sulfite de sodium 0.5 M, carbonate de sodium 0.45 M, bromure de potassium 33 mM), rincées dans 3 bains d'eau distillée, puis plongées dans un bain de fixateur à 20°C pendant 20 min (thiosulfate de sodium 1.2 M). Les coupes sont ensuite rincées pendant au moins 30 min dans l'eau distillée avant d'être colorées à l'hémalum de Mayer, puis montées dans l'Eukitt.

V.2. Hybridation *in situ* en double marquage

Pour les expériences d'hybridation *in situ* en double marquage, l'ARNm *c-fos* est détecté avec une sonde radioactive marquée à l'UTP- $\alpha^{35}\text{S}$ (cf. § V.1.1., ci-dessus) directement sur la même coupe que les ARNm TH (tyrosine hydroxylase, marqueur des neurones dopaminergiques dans la VTA) ou GAD/67 (isoforme 67 de l'acide glutamique décarboxylase, marqueur des neurones GABAergiques) qui sont détectés avec des sondes non radioactives marquées à l'UTP-11-digoxygénine.

V.2.1. Marquage des sondes ARNc à l'UTP-11-digoxygénine par transcription *in vitro* (ARN-digoxygénine)

Les sondes ARNc antisens simple brin non radioactives sont marquées par l'incorporation d'UTP-11-digoxygénine (Roche Diagnostics, France) lors de la transcription *in vitro* par la RNA polymérase T7 (Roche Diagnostics, France) de ① l'ADNc TH de rat contenu dans le plasmide pBluescript II SK (séquence codante de 0.6 kb) (préparé par le Dr Francesco Di Blasi, INSERM U 588), ou de ② l'ADNc GAD/67 de rat contenu dans le plasmide PSPT18 (séquence codante de 1.4 kb) (Julien *et al.*, 1987). 50 à 100 ng de plasmide linéarisé servent de matrice pour la transcription qui est réalisée grâce au protocole suivant :

Plasmide linéarisé (100 à 200 ng/ μL)	0.5 μL (soit 50 à 100 ng)
Tampon de l'enzyme 5x	2 μL
rNTPs (CTP, GTP, ATP) 5 mM	1 μL
UTP 10 mM	0.5 μL
UTP-11-digoxygénine 10 mM	0.5 μL
H ₂ O DEPC	4 μL
RNAsine (Promega, France)	0.5 μL
SP6 RNA Polymérase (Roche Diagnostics, France)	0.5 μL

Le mélange est incubé à 37°C pendant 2 hr (0.5 μL de RNA polymérase est rajouté en cours d'incubation). A la fin de la transcription, le plasmide est détruit par 1 μL de DNase-RNase free et les RNAses sont inhibées par 1 μL de RNAsine. Le mélange est incubé 15 min à 37°C. La sonde est ensuite dénaturée 5 min à 65°C afin d'éviter les auto-appariements. La réaction est arrêtée par 1 μL

d'EDTA 250 mM, puis 1 µL d'ARNt (10 µg/µL) est ajouté. Le volume réactionnel est complété à 50 µL avec de l'eau DEPC et les transcrits sont ramenés à une taille de 0.25 kb en moyenne, par hydrolyse alcaline, de la même manière que pour les sondes radioactives (cf. § V.1.1., ci-dessus). La sonde est ensuite précipitée dans une solution d'acétate de sodium 3 M/éthanol absolu (0.1/2.5 v/v) pH 5.0 pendant au moins une nuit à -20°C. Après centrifugation (1 à 2 hr, 10000 g), les culots sont séchés à la pompe à vide puis repris dans 50 µL total de Tris-EDTA 1x. La sonde ainsi marquée est conservée à -20°C jusqu'à hybridation.

V.2.2. Protocole d'hybridation : double marquage

Pour les doubles marquages, le protocole d'hybridation est légèrement modifié par rapport à celui décrit pour l'hybridation des sondes radioactives en simple marquage (cf. § V.1.2., ci-dessus). Les coupes sont pré-hybridées de façon identique, mais l'hybridation se fait en incorporant les 2 sondes, radioactive (10^6 cpm) et non radioactive (0.5 à 2 µL), au mélange d'hybridation (50 µL total). Les rinçages de la post-hybridation ne contiennent pas de DTT : SSC 4x (3 fois 5 min), SSC 4x/RNase A 20 µg/mL (20 min, 37°C), SSC 2x (10 min), SSC 1x (5 min), SSC 0.5x (5 min), SSC 0.1x (2 fois 30 min, 65°C), SSC 0.1x (15 min, température ambiante). Les lames sont ensuite prétraitées pour la détection du signal non radioactif. Les coupes sont rincées 2 fois pendant 5 min dans le tampon A (1 M NaCl, 0.1 M Tris, 2 mM MgCl₂, pH 7.5), puis dans le tampon A contenant 3% de sérum normal de chèvre (NGS) et 0.3% de Triton x-100 (30 min). Après 5 hr d'incubation à température ambiante avec l'anticorps anti-digoxygénine couplé à la phosphatase alcaline (Roche Diagnostics, France ; dilué au 1/1000 dans le tampon A, 3% NGS, 0.3% Triton x-100), les coupes sont rincées dans le tampon A (5 min, 2 fois) et dans le tampon STM (10 min, 2 fois ; 1 M NaCl, 0.1 M Tris, 5 mM MgCl₂, pH 9.5), puis séchées à l'air libre.

Les lames sont d'abord traitées pour la détection du signal radioactif afin de préserver une bonne sensibilité pour le marqueur de réactivité neuronale *c-fos*, puis révélées après 3 mois d'exposition à l'obscurité comme décrit précédemment. Pour la détection du signal non radioactif (digoxygénine), les coupes sont ensuite rincées dans le tampon STM 0.1 M pH 9.5 (5 min, 2 fois) puis incubées pendant une nuit à l'obscurité dans du STM 0.1 M pH 9.5 contenant 0.34 mg/mL de nitrobleu tetrazolium et 0.18 mg/mL de bromo-chloro-indolylphosphate. Les coupes sont alors rincées dans l'eau distillée (10 min, 3 fois), avant d'être montées dans l'Eukitt sans contre coloration.

V.3. Quantification par analyse d'image

Les techniques de quantification utilisées permettent d'étudier des modifications d'expression génique par la mesure des variations relatives des quantités d'ARNm, et ceci, à différents niveaux : ① à un niveau anatomique régional, par mesures densitométriques sur film rayon X (macroautoradiographie), ce qui permet la mise en évidence de variations globales des quantités d'ARNm au sein de certaines structures cérébrales, mais également ② à un niveau cellulaire, par comptage des neurones marqués ou des grains d'argent par neurones marqués sur coupes histologiques (microautoradiographie). Les

niveaux anatomiques ainsi que l'ensemble des structures cérébrales que nous avons analysées pour l'expression de l'ARNm *c-fos* sont représentés sur la Figure 16 (d'après Paxinos & Watson, 1997).

Afin d'obtenir une bonne fiabilité des mesures, ces techniques quantitatives imposent un certain nombre de contraintes de standardisation depuis l'organisation des expériences d'hybridation *in situ* jusqu'à la quantification par analyse d'image. Ainsi, dans nos 2 études (aspects inconditionnés et conditionnés du sevrage), les lames des différents groupes expérimentaux correspondant à un niveau anatomique donné ont toujours été traitées et manipulées dans les mêmes conditions, avec les mêmes tampons et en utilisant la même solution d'hybridation. Pour un niveau anatomique donné, 2 coupes par animal ont été analysées pour les mesures densitométriques et 1 coupe par animal a été mesurée pour l'analyse cellulaire.

V.3.1. Analyse par densitométrie sur film rayon X

Les mesures d'intensité du marquage sur film rayon X ont été réalisées sur un système informatique d'analyse d'images (Biocom, les Ulis, France), équipé du logiciel Densirag 200 conçu pour mesurer de façon relative des intensités de niveaux de gris et les transformer en densité optique. La densité optique augmente de façon linéaire avec la concentration de radioactivité en fonction du temps d'exposition (Le Moine, 2000). Il est donc nécessaire d'adapter les temps d'exposition en fonction du marqueur étudié afin de se situer toujours dans cette zone de linéarité. Dans toute nos expériences, les films rayon X ont été exposés au maximum un mois (ce qui correspond au tiers de la $\frac{1}{2}$ vie du ^{35}S) ne permettant pas la saturation dans nos conditions. Un film rayon X donné contient les lames de tous les animaux de chaque groupe pour un niveau anatomique donné. Au début de chaque série de mesure et pour chaque film rayon X, une valeur de transmission maximale est mesurée sur le fond du film, puis une valeur de transmission relative est mesurée sur une partie de la coupe non marquée (par exemple sur le corps calleux). Les mesures de niveau de gris sont ensuite effectuées au niveau des structures à analyser et le logiciel calcule directement une valeur de densité optique relative. Dans chaque région cérébrale analysée, les valeurs de densité optique sont moyennées pour chaque groupe expérimental. Les valeurs moyennes sont exprimées \pm SEM.

V.3.2. Analyse microscopique par comptage de neurone

Au niveau cellulaire (analyse microscopique), les neurones marqués ont été comptés à l'aide du même système informatique d'analyse d'images, équipé cette fois-ci du logiciel VisioScan 200 qui permet le repérage de territoires ou de cellules identifiées selon des coordonnées cartésiennes. Dans le cas des expériences de simple marquage pour l'ARNm *c-fos*, ce système permet de pointer et de compter le nombre de neurones marqués (signal radioactif) à l'intérieur d'une structure cérébrale donnée et de calculer la densité de neurones par unité de surface dans la région analysée. Notre critère pour un neurone *c-fos* positif était que sa densité de grains d'argent soit au moins 2 fois supérieure à celle du bruit de fond (Le Moine, 2000). Dans le cas des expériences de double marquage sur le même matériel (Le Moine & Bloch, 1995; Le Moine, 2000), ce système nous a permis également de quantifier la densité de neurones exprimant l'ARNm *c-fos* (signal radioactif) dans des

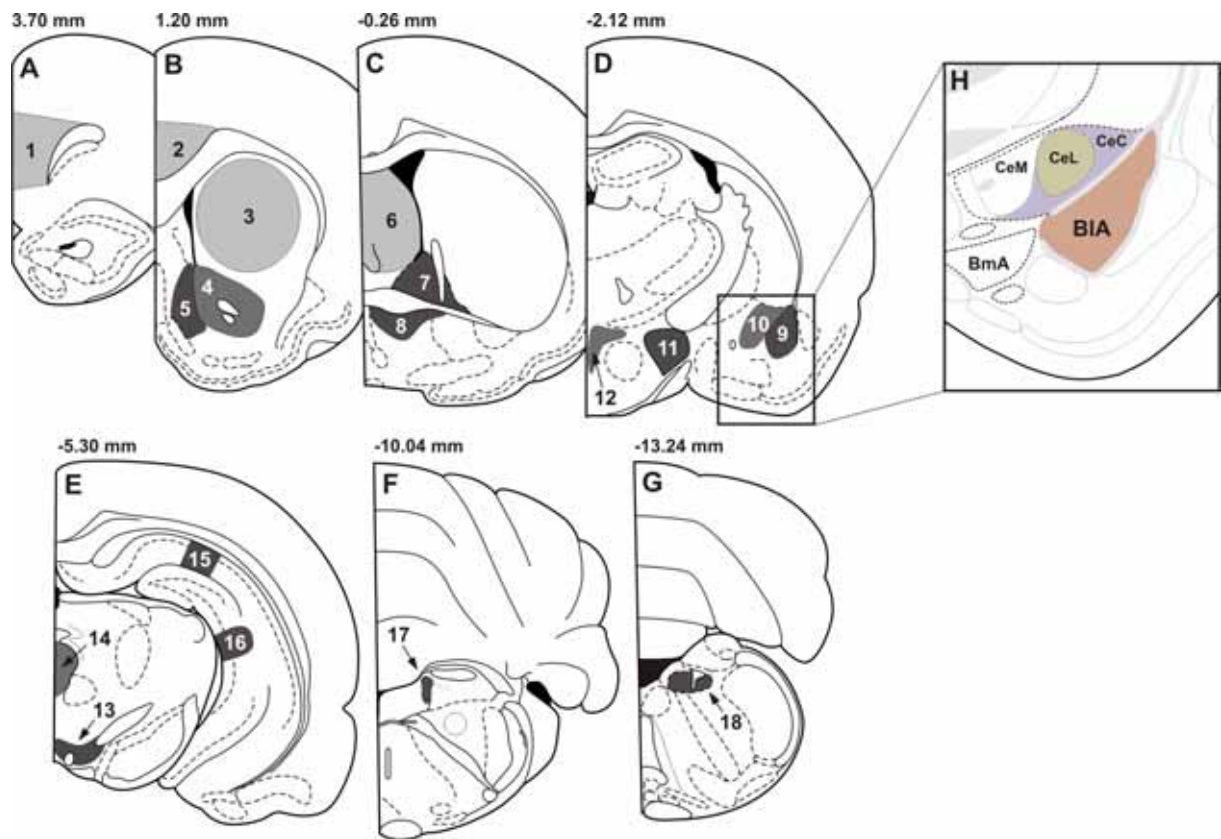


Figure 16. Niveaux anatomiques et structures cérébrales analysées pour l'expression de l'ARNm *c-fos* (d'après Paxinos & Watson, 1997).

(A–G) Niveaux anatomiques selon l'axe rostro-caudal utilisés pour la quantification et leurs distances à partir du Bregma en mm. La méthode de mesure par densitométrie (régions colorées en gris clair) a été choisie pour des structures facilement délimitables sur film rayon X en conditions basales (LS, CPU et structures corticales), alors que l'analyse au niveau cellulaire a été choisie pour les régions qui nécessitent une délimitation plus fine avec des points de repères précis (AcbS et AcbC, BNSTv et BNSTd, CeA et BIA, régions hypothalamiques, VTA, LC, NTS, hippocampe et PAG). NB : lorsque le marquage était suffisamment intense, le PVH et la LHA ont été quantifiés par densitométrie. 18 structures cérébrales ont été quantifiées : 1, cortex prélimbique (PIC) ; 2, cortex cingulaire (CgC) ; 3, striatum dorsal (noyau caudé-putamen, CPU) ; 4, noyau accumbens partie core (AcbC) ; 5, noyau accumbens partie médiale shell (AcbS) ; 6, septum latéral (LS) ; 7, noyau du lit de la strie terminale partie dorsale (BNSTd) ; 8, noyau du lit de la strie terminale partie ventrale (BNSTv) ; 9, noyau basolatéral de l'amygdale (BIA) ; 10, noyau central de l'amygdale (CeA) ; 11, aire hypothalamique latérale (LHA) ; 12, noyaux paraventriculaire de l'hypothalamus (PVH) ; 13, aire tegmentale ventrale (VTA) ; 14, substance grise périaqueducatale (PAG) ; 15, champ CA1 de l'hippocampe (CA1) ; 16, champ CA3 de l'hippocampe (CA3) ; 17, locus coeruleus (LC) ; 18, noyau du tractus solitaire (NTS). (H) Détail des noyaux de l'amygdale. Le noyau central (CeA) se subdivise en 3 parties : capsulaire (CeC), latérale (CeL) et médiale (CeM). Dans certains cas, les mesures d'expression de *c-fos* ont pu être réalisées en séparant le CeC du CeL. BmA, noyau basomédial de l'amygdale.

populations neuronales de la VTA et de l'amygdale identifiées par l'ARNm TH et/ou GAD/67 (signal non radioactif). Dans chaque région cérébrale analysée et pour chaque population neuronale, la densité de neurones *c-fos* positif par mm² est moyennée pour chaque groupe expérimental. Les valeurs moyennes sont exprimées \pm SEM.

V.3.3. Analyse microscopique par comptage de grains

Nous avons également été amené à étudier les niveaux d'expression de l'ARNm *c-fos* par neurone dans les neurones identifiés du noyau basolatéral de l'amygdale (BIA), au cours du sevrage précipité par la naloxone dans un environnement particulier (compartiment du « *Y-maze* »). Le nombre de grains d'argent dans une cellule est fonction de la quantité de lumière réfléchiée en épiluminescence. Après calibration, le système informatique d'analyse d'image équipé du logiciel VisioScan 200 donne une estimation du nombre de grains exprimé par neurone identifié (Le Moine, 2000). Pour chaque coupe, une courbe étalon est réalisée sous épiluminescence par mesure de la quantité moyenne de lumière réfléchiée par un nombre connu de grains d'argent (i.e. 0, 1 et 2 grains) dans une surface constante. La cellule à mesurer est ensuite identifiée et détournée en lumière transmise. La quantité de lumière transmise dans la surface cellulaire est mesurée en épiluminescence et la densité optique est transformée directement en densité de grain d'argent par cellule (nombre de grains par unité de surface). Les distributions de fréquence de la densité de grains d'argent par unité de surface (100 μm^2) pour les différentes populations neuronales du BIA ont été exprimées pour les deux groupes expérimentaux (groupes Nal120 et Sal).

V.4. Analyses statistiques

Pour les aspects inconditionnés du sevrage, les analyses statistiques ont été réalisées sur les données brutes individuelles des animaux des 5 groupes expérimentaux (naloxone 0, 7.5, 15, 30 et 120 $\mu\text{g}/\text{kg}$), en utilisant une analyse de variance paramétrique (ANOVA) suivie d'un test *post hoc* (« *Newman-Keuls multiple comparison test* ») qui permet de comparer deux à deux les variations pour toutes les doses de naloxone.

Pour les aspects conditionnés du sevrage, comme précédemment, les données brutes ont été analysées par une ANOVA suivie d'un test de « *Newman-Keuls multiple comparison test* » qui compare deux à deux les variations parmi les 4 groupes d'animaux conditionnés (ENV+/cs+, ENV+/cs-, ENV- et Ct), et en utilisant un t-test non apparié pour comparer les effets de l'injection aiguë de naloxone (groupe Nal120) par rapport au contrôle (groupe Sal). Pour les groupes Nal120 et Sal, les distributions de fréquence de la densité de grains d'argent par unité de surface pour les différentes populations neuronales du BIA ont été comparées en utilisant le « *Kolmogorov-Smirnov sample test* ». Un t-test non paramétrique (« *Mann Whitney test* ») a également été utilisé pour comparer les médianes de densité de grains d'argent entre les 2 groupes.

CHAPITRE 1

Substrats neurobiologiques des composantes motivationnelle et somatique du sevrage des opiacés précipité par la naloxone

CHAPITRE 1

Substrats neurobiologiques des composantes motivationnelle et somatique du sevrage des opiacés précipité par la naloxone

I. INTRODUCTION

La consommation répétée de substances opiacées aboutit à la dépendance, et la cessation abrupte de l'usage de drogue engendre l'apparition d'un intense syndrome de sevrage. Le désir d'éviter cet état aversif a été isolé comme facteur pouvant contribuer à la nature compulsive de la consommation et de l'abus d'opiacés (Koob, 1996; Koob & Le Moal, 1997; Bechara *et al.*, 1998). Chez le rat morphino-dépendant, le syndrome de sevrage précipité par la naloxone se caractérise par l'émergence d'un état affectif négatif (Mucha, 1987; Higgins & Sellers, 1994), ainsi que par de nombreux symptômes somatiques (Gellert & Holtzman, 1978; Espejo *et al.*, 1995). L'indice comportemental le plus sensible qui caractérise l'aspect négatif et motivationnel du sevrage est l'expression d'une aversion de place conditionnée induite par la naloxone (Mucha, 1987; Hand *et al.*, 1988; Stinus *et al.*, 1990). En effet, l'aversion de place conditionnée peut être clairement révélée en utilisant de très faibles doses de naloxone lors du conditionnement (i.e. 7.5 µg/kg) (Caillé *et al.*, 1999), et peut s'exprimer jusqu'à plus d'un an chez le rat post-dépendant (Stinus *et al.*, 2000; L. Stinus & S. Caillé, données non publiées). Au contraire, l'ensemble de la symptomatologie physique du sevrage ne s'exprime que pour de plus fortes doses de naloxone, et chez le rat morphino-dépendant, au moins 30 µg/kg sont nécessaires pour l'apparition des premiers signes somatiques de sevrage (Schulteis *et al.*, 1994).

Diverses études utilisant des lésions, des injections intracérébrales d'antagonistes opiacés ou encore divers marqueurs de réactivité neuronale (comme certains IEGs), ont mis en évidence que le syndrome de sevrage des opiacés est sous-tendu par de nombreuses structures dans l'ensemble du cerveau (pour revues : Koob *et al.*, 1992; Harlan & Garcia, 1998). Néanmoins, ces études ont permis de souligner que les aspects motivationnels et somatiques de la dépendance aux opiacés pourraient être dissociés en terme de substrats neurobiologiques, comme proposé initialement par Bozarth & Wise (1984). La composante motivationnelle du sevrage semble être principalement médiée par le système nerveux central au niveau de diverses structures limbiques (faisant partie intégrante de l'« *extended amygdala* ») comme le noyau accumbens, l'amygdale (Hand *et al.*, 1988; Stinus *et al.*, 1990; Heinrichs *et al.*, 1995), et le BNST (Delfs *et al.*, 2000). En revanche, la composante somatique du sevrage semble dépendre plus spécifiquement de structures du mésencéphale et du tronc cérébral. En effet, des injections locales de méthylnaloxonium – un antagoniste opiacé lipophile qui ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique – ont montré que les structures cérébrales les plus sensibles pour déclencher l'apparition de symptômes somatiques du sevrage de la morphine sont le locus coeruleus (LC) et la substance grise périaqueducatale (PAG), alors que les moins sensibles sont l'amygdale et le noyau accumbens (Acb) (Maldonado *et al.*, 1992).

Cependant, l'hypothèse proposant que des substrats neurobiologiques différents puissent être impliqués de manière spécifique dans les composantes motivationnelle et somatique du sevrage des opiacés reste quelque peu controversée. En effet, les effets médiés par le récepteur dopaminergique de type D₂ dans le noyau accumbens ont été directement impliqués dans la genèse de certains signes somatiques du sevrage de la morphine (Harris & Aston-Jones, 1994; Druhan *et al.*, 2000; Walters *et al.*, 2000), alors qu'au contraire, la lésion totale des neurones noradrénergiques du locus coeruleus ne modifie absolument pas la symptomatologie physique du sevrage (Caillé *et al.*, 1999), remettant en question le rôle majeur attribué à ce noyau dans l'induction de certains signes somatiques (Aghajanian, 1978; Maldonado, 1997). Ces résultats contradictoires, ainsi que le manque d'approche globale concernant l'étude des substrats neurobiologiques des deux composantes du sevrage, témoignent de la nécessité d'une analyse systématique, permettant de cartographier de manière précise et extensive les structures cérébrales recrutées chez le rat morphino-dépendant après un syndrome de sevrage précipité par une gamme complète de doses de naloxone.

Notre but a donc été d'analyser de manière extensive les substrats neurobiologiques impliqués dans la composante motivationnelle et dans la composante somatique du sevrage. Pour cela, nous avons « tracé » le marquage du proto-oncogène *c-fos* dans l'ensemble du cerveau, après un sevrage précipité par la naloxone chez le rat morphino-dépendant, et nous avons quantifié l'expression de son ARNm dans 18 structures cérébrales (illustrées sur la Figure 16), en utilisant l'hybridation *in situ* quantitative. L'expression de l'ARNm *c-fos* a été analysée suite à l'administration aiguë de doses croissantes de naloxone, choisies sur la base d'une étude comportementale globale des différents signes du sevrage : 7.5 et 15 µg/kg (qui induisent un état affectif aversif associé au sevrage) versus 30 et 120 µg/kg (qui précipitent les symptômes somatiques du sevrage).

II. RESULTATS⁷

II.1. Analyse globale des données comportementales concernant le sevrage des opiacés

La détermination des valeurs de DE₅₀ pour chacun des signes somatiques du sevrage (Figure 17, diagramme du haut, encart gris) montre que les symptômes « ébrouements », « mâchonnements », « torsions abdominales » et « vocalisations au toucher » sont très sensibles à la naloxone, comme le reflète leur valeur de DE₅₀ (respectivement 8.3, 8.9, 10.7 et 11.9 µg/kg). En revanche, les valeurs de DE₅₀ pour les signes « perte de poids », « sauts », « diarrhées » et « salivation » sont plus élevées (respectivement 21.2, 30.0, 32.2 et 67.3 µg/kg). Par conséquent, les signes somatiques ont été classés en relation avec leur sensibilité à la naloxone et divisés en deux groupes en fonction de leur valeur de DE₅₀. Le premier groupe inclut les signes possédant une valeur de DE₅₀ < 20 µg/kg (ébrouements, mâchonnements, torsions abdominales et vocalisations au toucher), et le second

⁷ Les figures correspondant à cette étude sont insérées à la fin du Chapitre 1 dans la partie intitulée « Figures du Chapitre 1 ».

groupe inclut les signes ayant une valeur de $DE_{50} > 20 \mu\text{g/kg}$ (perte de poids, sauts, diarrhées et salivation). Les valeurs de DE_{50} globales sont $10.2 \mu\text{g/kg}$ pour le premier groupe, et $36.7 \mu\text{g/kg}$ pour le second (Figure 17, diagramme du haut). Il est important de noter que les signes qui constituent le premier groupe sont plus reliés à l'émergence d'un état de malaise aversif interne, de peur et d'anxiété, alors que les symptômes du second groupe sont généralement liés à des manifestations périphériques. Par ailleurs, les scores d'aversion de place conditionnée induite par la naloxone augmentent de façon dose-dépendante (Figure 17, diagramme du bas), et la sensibilité à la naloxone de cet indice comportemental qui révèle la composante négative motivationnelle du sevrage est très faible, comme le montre sa valeur de DE_{50} ($4.7 \mu\text{g/kg}$).

Cette analyse globale montre que $20 \mu\text{g/kg}$ représente une dose critique dans la sensibilité à la naloxone des multiples indices comportementaux du sevrage. Ainsi, afin de couvrir l'ensemble des caractéristiques du sevrage (composantes motivationnelle et somatique), deux doses de naloxone $< 20 \mu\text{g/kg}$ (7.5 et $15 \mu\text{g/kg}$) et deux doses au dessus de cette limite (30 et $120 \mu\text{g/kg}$) ont été choisies pour l'analyse de l'expression de l'ARNm *c-fos*.

Afin de vérifier que ces doses de naloxone ne sont pas aversives par elles-mêmes dans nos conditions expérimentales, nous les avons testées dans le modèle d'aversion de place conditionnée chez des rats placebos (sans morphine). Les scores d'aversion de place conditionnée pour chacun des compartiments en fonction des doses croissantes de naloxone utilisées pour le conditionnement ($0, 7.5, 15, 30, 120, 240$ et $1000 \mu\text{g/kg}$) sont illustrés sur la Figure 18. Les résultats montrent qu'il n'y a aucune différence statistiquement significative entre le temps passé dans chacun des compartiments avant et après les sessions de conditionnement, quelle que soit la dose de naloxone utilisée, incluant des doses $> 120 \mu\text{g/kg}$ (« *Wilcoxon matched pairs test* » : $P > 0.1$ pour tous les compartiments). Ainsi, la cartographie de l'expression de l'ARNm *c-fos* induite par la naloxone a été réalisée uniquement chez des rats morphino-dépendants qui, au contraire des rats placebos, montrent une aversion de place conditionnée induite par de très faibles doses de naloxone (Figure 17, diagramme du bas).

II.2. Cartographie de l'expression de l'ARNm *c-fos* dans le cerveau après un sevrage précipité par la naloxone chez le rat morphino-dépendant

En situation contrôle, le niveau basal d'expression de *c-fos* dans l'ensemble des structures sous-corticales est extrêmement faible alors que le cervelet et certaines aires corticales présentent un marquage *c-fos* significatif (Figure 19, Nal $0 \mu\text{g/kg}$). Le sevrage de la morphine s'accompagne d'une augmentation de l'expression de l'ARNm *c-fos* dans un grand nombre de structures cérébrales après l'administration de différentes doses de naloxone (Figure 19). Cependant, la sensibilité à la naloxone de ces territoires cérébraux est très différente selon la dose utilisée. En effet, les structures limbiques de l'« *extended amygdala* » présentent des inductions de *c-fos* à partir des plus faibles doses de naloxone (i.e. 7.5 ou $15 \mu\text{g/kg}$). Par exemple, une intense induction de l'ARNm *c-fos* est détectée dans le BNST et le CeA après une injection de $7.5 \mu\text{g/kg}$ de naloxone (Figure 19 niveaux C et D) et l'expression de l'ARNm *c-fos* est détectée dans l'Acb et d'autres noyaux de l'amygdale (médial, basomédial et cortical) dès $15 \mu\text{g/kg}$. L'hippocampe et le subiculum montrent également un marquage

c-fos dès les faibles doses de naloxone (Figure 19 niveau E). En revanche, un grand nombre d'autres structures, incluant le CPu (Figure 19 niveau B), les aires thalamiques et hypothalamiques (Figure 19 niveau D), et les noyaux noradrénergiques et dopaminergiques (Figure 19 niveaux E–G) présentent des niveaux détectables d'ARNm *c-fos* uniquement pour les plus fortes doses de naloxone (i.e. 30 ou 120 µg/kg). Un intense marquage *c-fos* est également détecté dans de nombreuses aires corticales suite à l'injection de différentes doses de naloxone, et certaines d'entre elles présentent un niveau basal d'expression relativement élevé en situation contrôle. L'analyse quantitative a été réalisée sur 18 structures cérébrales (illustrées sur la Figure 16), qui ont été sélectionnées sur la base de leur implication possible dans la composante motivationnelle et/ou la composante somatique du syndrome de sevrage des opiacés.

II.3. Analyse quantitative de l'expression de *c-fos* après un sevrage précipité par des doses croissantes de naloxone

II.3.1. Aires striatales, septum latéral et structures de l'« extended amygdala ».

Dans la partie médiale shell de l'Acb (AcbS ; Figure 20A), la densité de neurones exprimant l'ARNm *c-fos* est augmentée après une dose de 15 µg/kg de naloxone (+98% ; $P < 0.01$ versus contrôle), alors que dans la partie core de l'Acb (AcbC ; Figure 20A) et le noyau caudé-putamen (CPu ; Figure 20E), une dose de 120 µg/kg est nécessaire pour induire l'ARNm *c-fos* (+116% pour l'AcbC, +45% pour le CPu ; $P < 0.001$ versus contrôle pour les deux structures). De plus, l'augmentation de l'expression de *c-fos* mesurée dans l'AcbS est dose-dépendante entre 15 et 120 µg/kg (voir Figure 20A pour la significativité), et cette structure striatale présente la plus forte intensité d'induction de *c-fos* après 120 µg/kg (+459% ; $P < 0.001$ versus contrôle) en comparaison avec l'AcbC et le CPu. On peut également remarquer que dans le CPu, les niveaux d'ARNm *c-fos* sont légèrement diminués par rapport au contrôle après une injection de 7.5 µg/kg de naloxone (-32% ; $P < 0.05$).

Dans le septum latéral (LS), le syndrome de sevrage précipité par la naloxone induit un pattern d'expression de l'ARNm *c-fos* similaire à celui de l'AcbS (Figure 20B). En effet, l'induction de *c-fos* dans le LS est dose-dépendante (voir Figure 20B pour la significativité) à partir de la dose 15 µg/kg de naloxone (+95% ; $P < 0.05$ versus contrôle) et atteint +266% ($P < 0.001$ versus contrôle) après l'administration de 120 µg/kg.

Dans les parties ventrale et dorsale du noyau du lit de la strie terminale (BNSTv et BNSTd ; Figure 20C), la densité de neurones *c-fos* positifs est augmentée après une injection de 7.5 µg/kg de naloxone (+48% pour le BNSTv, +49% pour le BNSTd ; $P < 0.05$ versus contrôle pour le BNSTv), bien que l'augmentation mesurée dans le BNSTd n'atteigne pas la significativité statistique. Dans les deux sous-divisions du BNST, les inductions de l'ARNm *c-fos* sont dose-dépendantes entre les doses 7.5 et 120 µg/kg (voir Figure 20C pour la significativité), et ces variations sont relativement similaires entre les deux noyaux en terme d'intensité pour chaque dose de naloxone. Après l'administration de 120 µg/kg, les niveaux d'ARNm *c-fos* atteignent +360% dans le BNSTv et +337% dans le BNSTd ($P < 0.001$) par rapport à la situation contrôle.

Dans l'amygdale, le nombre de neurones exprimant l'ARNm *c-fos* a été mesuré dans le noyau central et le noyau basolatéral (respectivement CeA et BIA ; Figure 20D et Figure 21). En condition contrôle, le niveau basal d'expression de l'ARNm *c-fos* est significativement plus élevé dans le BIA que dans le CeA (209 ± 9 neurones par mm^2 dans le BIA et 91 ± 8 neurones par mm^2 dans le CeA ; t-test apparié : $P < 0.0001$) (Figure 20D et Figure 21A). Ces noyaux de l'amygdale sont très sensibles aux injections de naloxone et présentent d'intenses modifications de l'expression de l'ARNm *c-fos* dès la plus faible dose de naloxone (i.e. $7.5 \mu\text{g}/\text{kg}$; Figure 20D). De surcroît et de manière intéressante, ces variations sont opposées entre les deux noyaux puisqu'une activation est détectée dans le CeA, alors que l'expression de l'ARNm *c-fos* est diminuée dans le BIA par rapport à la situation contrôle (Figure 20D et Figure 21A et B). En effet, le sevrage précipité par la naloxone avec une dose de $7.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ provoque une intense augmentation de l'expression de *c-fos* dans le CeA ($+166\%$; $P < 0.001$ versus contrôle), alors que la densité de neurones *c-fos* positifs dans le BIA est diminuée par rapport au contrôle (-29% ; $P < 0.001$ versus contrôle). De plus, aussi bien l'induction de l'expression de *c-fos* dans le CeA que la diminution mesurée dans le BIA sont dose-dépendantes entre 7.5 et $120 \mu\text{g}/\text{kg}$ (voir Figure 20D pour la significativité). Ces variations dose-dépendantes et opposées de l'expression de *c-fos* mesurées dans le CeA et le BIA sont illustrées sur la Figure 21. Dans les différentes sous-divisions du CeA, la majorité de l'expression de *c-fos* induite par la naloxone est restreinte à la partie capsulaire (Figure 21, flèche blanche), alors que le marquage de la partie latérale est moins intense (Figure 21, étoile blanche). Les modifications les plus importantes de l'expression de *c-fos* ont été mesurées lorsque le sevrage a été précipité avec $120 \mu\text{g}/\text{kg}$ de naloxone ($+614\%$ pour le CeA, -73% pour le BIA ; $P < 0.001$ versus contrôle pour les deux structures). Dans cette situation, la différence d'intensité de marquage *c-fos* entre ces deux noyaux est très importante, comme le montre la grande densité de neurones *c-fos* positifs mesurée dans le CeA (649 ± 37) alors que seulement 56 ± 6 neurones par mm^2 dans le BIA expriment l'ARNm *c-fos* (Figure 20D et Figure 21E). Il est également important de noter que le CeA est la structure cérébrale la plus sensible aux injections de naloxone car ce noyau présente les plus importantes inductions de l'ARNm *c-fos* quelle que soit la dose de naloxone utilisée ($+166$, $+293$, $+400$ et $+614\%$ par rapport à la situation contrôle avec respectivement 7.5 , 15 , 30 et $120 \mu\text{g}/\text{kg}$).

II.3.2. Noyaux dopaminergiques et noradrénergiques

Dans l'aire tegmentale ventrale (VTA ; Figure 20F), le locus cœruleus (LC ; Figure 20G) et le noyau du tractus solitaire (NTS ; Figure 20H), des inductions significatives de l'expression de l'ARNm *c-fos* sont détectées avec $30 \mu\text{g}/\text{kg}$ de naloxone et des augmentations encore plus importantes sont mesurées après $120 \mu\text{g}/\text{kg}$. Dans la VTA, le niveau basal d'expression de *c-fos* est très faible (23 ± 5 neurones par mm^2 chez les rats contrôles) et la densité de neurones *c-fos* positifs est fortement augmentée après 30 et $120 \mu\text{g}/\text{kg}$ de naloxone (respectivement $+158$ et $+381\%$; $P < 0.001$ versus contrôle pour les deux doses). Le LC présente également d'intenses inductions de l'ARNm *c-fos* après 30 et $120 \mu\text{g}/\text{kg}$ (respectivement $+321$ et 492% ; $P < 0.001$ versus contrôle pour les deux doses), par rapport à la densité de neurones *c-fos* positifs mesurés dans le NTS (respectivement $+54$ et $+124\%$; respectivement $P < 0.05$ et $P < 0.001$ versus contrôle). En effet, le nombre de neurones *c-fos* positifs

par mm² atteint 963 ± 83 dans le LC après l'administration de 120 µg/kg de naloxone (par rapport à 163 ± 43 neurones par mm² chez les animaux contrôles ; $P < 0.001$) et dans cette situation, quasiment tous les neurones présentent un intense marquage, comme illustré sur la Figure 22.

II.3.3. Aires corticales et hypothalamiques, hippocampe et substance grise périaqueductale

L'analyse quantitative révèle que les modifications de l'expression de l'ARNm *c-fos* induites par la naloxone dans les cortex prélimbique (PIC ; Figure 23A) et cingulaire (CgC ; Figure 23B), ainsi que dans le champ CA3 de l'hippocampe (CA3 ; Figure 23C) ne sont pas dose-dépendantes. En effet, dans le PIC, la plus importante induction significative de *c-fos* est mesurée pour la dose 15 µg/kg de naloxone ($P < 0.01$ versus contrôle), alors que les niveaux d'ARNm *c-fos* sont plus faibles après l'administration de 30 ou 120 µg/kg ($P < 0.05$ versus contrôle pour les deux doses). Dans CA3, les inductions significatives de l'ARNm *c-fos* sont détectées après 15 et 120 µg/kg de naloxone (respectivement $P < 0.05$ et $P < 0.01$ versus contrôle), alors que les doses de 7.5 et 30 µg/kg n'ont aucun effet. Dans le CgC, uniquement la plus forte dose de naloxone provoque une faible augmentation de l'expression de *c-fos* par rapport aux rats contrôles ($P < 0.05$). On peut également remarquer que le pattern d'expression de *c-fos* est relativement similaire entre ces trois structures cérébrales. En revanche, dans le champ CA1 de l'hippocampe (CA1 ; Figure 23C), les niveaux d'ARNm *c-fos* sont augmentés de façon dose-dépendante dès la dose 7.5 µg/kg de naloxone (+71% ; $P < 0.05$ versus contrôle), et atteignent +280% ($P < 0.001$ versus contrôle) après 120 µg/kg. La majorité du marquage dans l'hippocampe est localisée dans la couche des cellules pyramidales, alors que très peu de neurones marqués sont détectés dans les « *strata oriens* » et « *radiatum* ».

Dans le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (PVH ; Figure 23D) et dans la substance grise périaqueductale (PAG ; Figure 23F) une injection de 30 µg/kg de naloxone est nécessaire pour provoquer une induction de l'ARNm *c-fos* (respectivement +199 et +60% ; $P < 0.01$ pour le PVH, $P < 0.05$ pour la PAG versus contrôle). Une augmentation de l'expression de *c-fos* est également mesurée dans le PVH avec 15 µg/kg (+85%), mais n'atteint pas le seuil de significativité. Dans le PVH et la PAG, les niveaux d'expression de l'ARNm *c-fos* sont encore plus augmentés après l'injection de 120 µg/kg (voir Figure 23D et F pour la significativité) pour atteindre respectivement +313 et +159% ($P < 0.001$ versus contrôle pour les deux structures). En revanche, dans l'aire hypothalamique latérale (LHA ; Figure 23E) une dose de 120 µg/kg de naloxone est nécessaire pour induire l'expression de l'ARNm *c-fos* (+151% ; $P < 0.001$ versus contrôle).

II.4. Analyse de l'expression de *c-fos* dans des neurones identifiés de l'aire tegmentale ventrale et de l'amygdale

II.4.1. Les réponses *c-fos* dans la VTA concernent principalement les neurones GABAergiques et une faible sous-population de neurones dopaminergiques

La VTA est composée de neurones dopaminergiques et de neurones GABAergiques (Swanson, 1982; Kosaka *et al.*, 1987; Bayer & Pickel, 1991; Kalivas, 1993). Pour analyser dans quel type de neurones

de la VTA l'expression de l'ARNm *c-fos* est induit, nous avons réalisé des expériences de double marquage sur le même matériel avec une sonde radioactive pour l'ARNm *c-fos* et avec une sonde marquée à la digoxygénine dirigée soit contre l'ARNm TH, soit contre l'ARNm de la GAD/67. Ainsi, les neurones TH positifs (TH+) ou GAD/67 négatifs (GAD-) correspondent à la population des neurones dopaminergiques, alors que les neurones GAD/67 positifs (GAD+) ou TH négatifs (TH-) sont considérés comme étant GABAergiques. Le sevrage précipité par la naloxone provoque une augmentation dose-dépendante de la densité de neurones *c-fos*+/TH+ et *c-fos*+/TH- (voir Figure 24A pour la significativité) qui atteint respectivement 52 ± 10 et 68 ± 6 neurones par mm^2 ($P < 0.001$ versus contrôle dans les deux situations) après l'injection d'une dose de 120 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de naloxone. Les données sont identiques dans le cas du double marquage avec la sonde GAD/67, puisque l'ARNm *c-fos* est également induit de façon dose-dépendante (voir Figure 24C pour la significativité) dans les neurones GAD+ et GAD-, pour atteindre respectivement 79 ± 11 ($P < 0.001$ versus contrôle) et 52 ± 9 ($P < 0.01$ versus contrôle) neurones par mm^2 après 120 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de naloxone, ce qui confirme bien que la population GAD+ correspond à la population TH-.

L'ensemble de ces données montre que si l'on considère le nombre total de neurones *c-fos* positifs dans chaque groupe expérimental, environ 50% sont TH positifs (ou GAD-) et 50% sont TH négatifs (ou GAD+) (comme illustré par les histogrammes cumulatifs de la Figure 24A et C). Cependant, la densité des neurones TH+ est en moyenne 4 fois plus importante que la densité de neurones GAD+ dans la VTA (les moyennes \pm SEM du nombre de neurones TH+ et GAD+ dans nos conditions expérimentales sont respectivement 391 ± 14 et 113 ± 5 neurones par mm^2). Ainsi, pour estimer la proportion de neurones doublement marqués pour chacune des populations, nous avons exprimé le nombre de neurones *c-fos*+/TH+ en pourcentage de la population totale de neurones TH+ (Figure 24B). Nous avons également exprimé le nombre de neurones *c-fos*+/GAD+ en pourcentage de la population totale de neurones GAD+ (Figure 24D). Par conséquent, alors que seulement $13 \pm 2\%$ des neurones de la population TH+ expriment l'ARNm *c-fos* après 120 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de naloxone, la majorité des neurones GAD+ présentent également un marquage pour l'ARNm *c-fos* ($72 \pm 3\%$) dans cette même situation.

II.4.2. Expression de *c-fos* dans des neurones identifiés des noyaux central et basolatéral de l'amygdale au cours du sevrage des opiacés

II.4.2.a. Une grande majorité de neurones GAD négatifs est inhibée au cours du sevrage précipité par des doses croissantes de naloxone

Dans le BIA, des interneurones GABAergiques inhibiteurs contrôlent l'activité électrique de neurones efférents excitateurs glutamatergiques (pour revue : Pitkanen *et al.*, 1997). Pour déterminer quelle population neuronale dans le BIA présente des modifications spécifiques de l'expression de *c-fos*, nous avons réalisé des expériences de double marquage avec un sonde radioactive pour l'ARNm *c-fos* et une sonde froide dirigée contre l'ARNm de la GAD/67. Les neurones GAD positifs (GAD+) sont considérés comme étant GABAergiques, alors que les neurones GAD négatifs (GAD-) sont considérés comme appartenant à la population de neurones glutamatergiques. Cette expérience révèle que la diminution dose-dépendante de l'expression de l'ARNm *c-fos* mesurée dans le BIA au

cours du sevrage précipité par la naloxone affecte principalement la population glutamatergique (Figure 25A). En effet, les résultats de l'ANOVA montrent que la densité de neurones *c-fos*+/*GAD*+ n'est pas significativement modifiée en fonction des doses croissantes de naloxone (ANOVA : $P = 0.0438$; « *Newman-Keuls multiple comparison test* » : n.s., excepté $P < 0.05$ versus contrôle pour la dose de 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$), alors que le nombre de neurone *c-fos*+/*GAD*- par mm^2 diminue de façon dose-dépendante (voir Figure 25A pour la significativité), pour atteindre -67% ($P < 0.001$ versus contrôle) après une injection de 120 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de naloxone.

II.4.2.b. Réponse différentielle entre la partie capsulaire et la partie latérale du CeA au cours du sevrage précipité par des doses croissantes de naloxone

Le CeA contient en grande majorité des neurones épineux de taille moyenne de type GABAergiques (pour revue : Cassell *et al.*, 1999) et l'expérience de double marquage pour les ARNm *c-fos* et *GAD/67* au niveau de l'amygdale a permis de quantifier précisément l'expression de *c-fos* dans les différentes sous-divisions du CeA. En effet, les neurones GABAergiques sont distribués de manière beaucoup plus compacte dans la partie latérale (CeL) que dans la partie capsulaire (CeC) (voir Figure 25D et E). Le CeC présente une très importante augmentation dose-dépendante du nombre de neurones *c-fos* positifs (voir Figure 25B pour la significativité), qui atteint +1229% ($P < 0.001$ versus contrôle) après 120 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de naloxone (Figure 25D). De plus, le CeC est très sensible à la naloxone car le sevrage précipité par la plus faible dose de naloxone (i.e. 7.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) provoque une induction de *c-fos* de +350% ($P < 0.01$ versus contrôle). En revanche, le CeL ne montre une induction de l'ARNm *c-fos* que pour la dose de 120 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de naloxone (Figure 25C et E ; +164% ; $P < 0.001$ versus contrôle).

III. DISCUSSION

Nos résultats montrent que le sevrage de la morphine précipité par la naloxone est associé à des variations de l'expression de l'ARNm *c-fos* dans de nombreux territoires du cerveau, et que la sensibilité à la naloxone de ces structures est clairement différente en fonction de la dose utilisée. Nous montrons que des variations dose-dépendantes de l'expression de *c-fos* apparaissent de manière spécifique dans les structures du système limbique (AcbS, LS, BNST, CA1 et amygdale) après l'injection de faibles doses de naloxone (7.5 et 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$) chez des rats morphino-dépendants, alors que l'administration de doses plus élevées (30 et 120 $\mu\text{g}/\text{kg}$) est nécessaire pour induire l'ARNm *c-fos* dans de nombreuses autres structures cérébrales, incluant également certaines aires limbiques. En plus du fait que l'amygdale soit la structure la plus sensible en terme de réactivité neuronale, nous détectons des variations opposées du pattern d'expression de *c-fos* dans les noyaux principaux de l'amygdale (CeA et BIA) en réponse au sevrage précipité par des doses croissantes de naloxone. En effet, le CeA présente une intense activation de l'expression de l'ARNm *c-fos* corrélée positivement aux doses croissantes de naloxone, alors que, au contraire, les niveaux d'ARNm *c-fos* sont diminués fortement et de façon dose-dépendante dans le BIA.

Ainsi, l'utilisation d'une gamme complète de doses de naloxone, combinée à une procédure de détection extensive du marqueur de réactivité neuronale *c-fos* nous a permis de démontrer l'existence d'un circuit spécifique de structures au sein du système nerveux central, qui est recruté dès l'administration de très faibles doses de naloxone, et qui peut être par conséquent dissocié d'un ensemble d'autres régions cérébrales dans lesquelles l'induction de l'ARNm *c-fos* n'est détecté que pour les fortes doses.

Les IEGs comme *c-fos*, *c-jun* ou encore *zif/268* sont recrutés de manière transitoire par divers stimuli, et l'analyse de leur régulation est communément utilisée comme marqueur de la réactivité neuronale (pour revues : Morgan & Curran, 1995; Herdegen & Leah, 1998; Kovacs, 1998). La détection des produits du gène *c-fos* par hybridation *in situ* ou bien par immunohistochimie a été utilisée précédemment pour cartographier les territoires cérébraux impliqués dans le sevrage aigu des opiacés, en réponse à l'injection systémique de fortes doses d'antagonistes opiacés ($\geq 100 \mu\text{g/kg}$) (Georges *et al.*, 2000; Le Guen *et al.*, 2001). Le pattern d'expression de *c-fos* que nous détectons ici après l'injection de fortes doses de naloxone correspond parfaitement au grand nombre de structures cérébrales recrutées dans ces dernières études. De surcroît, notre cartographie *c-fos* révèle que certaines régions comme les aires striatales motrices (CPu, AcbC), les noyaux hypothalamiques (PVH et LHA), la PAG, et les noyaux dopaminergiques (VTA) et noradrénergiques (LC et NTS) ne sont recrutés que par l'injection de fortes doses de naloxone (30 et/ou 120 $\mu\text{g/kg}$). En revanche, nous montrons que l'AcbS, le LS, le BNST, le champ CA1 de l'hippocampe et l'amygdale sont les seules structures qui répondent en terme d'expression de l'ARNm *c-fos* à un sevrage précipité par de très faibles doses de naloxone (7.5 et/ou 15 $\mu\text{g/kg}$).

Une étude récente a également analysé les effets de la naloxone sur l'expression de la protéine c-Fos à des doses qui produisent des signes motivationnels du sevrage des opiacés, mais pas de symptomatologie somatique (Gracy *et al.*, 2001). Comme cette dernière étude ne visait pas à comparer spécifiquement les corrélats neurobiologiques des composantes motivationnelles et somatiques du sevrage, seulement trois structures limbiques ont été analysées. Ce travail a montré que le sevrage précipité par la naloxone est capable d'induire l'expression de la protéine c-Fos dans l'AcbS et le CeA dès la dose de 7.5 $\mu\text{g/kg}$, mais contrairement à nos données, aucune induction n'est détectée dans le BNST avec cette faible dose de naloxone. Ceci peut s'expliquer par la différence de sensibilité entre les deux procédures de détection (hybridation *in situ* versus immunohistochimie).

Afin de vérifier que les doses de naloxone que nous avons utilisées dans cette étude ne sont pas aversives par elles-mêmes, nous avons mesuré l'aversion de place conditionnée induite par une gamme de doses de naloxone (allant de 7.5 jusqu'à 1000 $\mu\text{g/kg}$) chez des rats placebos. Les résultats montrent que, dans nos conditions expérimentales, aucune de ces doses de naloxone n'est capable d'induire une aversion de place conditionnée chez ces animaux naïfs, ce qui de plus confirme des résultats obtenus dans de précédentes études (Schulteis *et al.*, 1994; Stinus *et al.*, 2000). En revanche, une intense aversion de place conditionnée est obtenue lorsque ces mêmes doses de naloxone sont administrées à des rats morphino-dépendants (voir Figure 17, diagramme du bas). Ces données indiquent que la naloxone n'est pas aversive par elle-même dans nos conditions

expérimentales, et que ses conséquences sur le comportement des rats morphino-dépendants peuvent être directement reliées à l'état de dépendance intense dans lequel se trouvent ces animaux.

Les effets de doses croissantes de naloxone chez des animaux placebo ont déjà été analysés dans divers modèles comportementaux (Schulteis *et al.*, 1994), montrant que 1000 µg/kg correspond à la dose minimale nécessaire pour supprimer une réponse opérante pour obtenir de la nourriture, et que cette même dose est incapable d'augmenter les seuils d'autostimulation intracérébrale. D'autres études ont également montré – en utilisant aussi bien l'hybridation *in situ* que l'immunohistochimie – que seule l'administration de très fortes doses d'antagonistes opiacés (20 mg/kg pour la naltrexone, 5000 et 2000 µg/kg pour la naloxone) est capable d'augmenter l'expression des produits du gène *c-fos* chez des rats placebos, et ceci dans un nombre très restreint de régions cérébrales. Dans ce cas, l'expression de c-Fos est augmentée dans le CeA, le NTS et le noyau supramammillaire, mais avec une intensité qui reste de trois à neuf fois inférieure à l'induction obtenue avec ces mêmes doses administrées chez des rats morphino-dépendants (Georges *et al.*, 2000; Gestreau *et al.*, 2000; Hamlin *et al.*, 2001; Le Guen *et al.*, 2001). En revanche, l'utilisation de doses plus faibles de naloxone, proches des doses que nous avons utilisées dans notre étude, injectées à des rats placebos, sont incapables d'induire l'expression de c-Fos ni dans le CeA, l'AcbS ou le BNST (Gracy *et al.*, 2001). Par conséquent, nous n'avons pas évalué l'effet de la naloxone chez des animaux placebos en terme d'expression de l'ARNm *c-fos*, et dans nos conditions expérimentales, les variations de *c-fos* induites par des doses croissantes de naloxone (allant de 7.5 à 120 µg/kg) chez des rats morphino-dépendants reflètent bien les régions cérébrales spécifiquement recrutées par le sevrage de la morphine.

L'ensemble de nos résultats ainsi que les données mentionnées ci-dessus montrent qu'une analyse extensive de l'expression de *c-fos* induite par des doses croissantes de naloxone chez des rats morphino-dépendants permet de discriminer entre des groupes de structures cérébrales qui sont préférentiellement impliquées dans l'une ou l'autre des composantes du syndrome de sevrage des opiacés (motivationnelle versus somatique). Notre analyse systématique de l'expression de *c-fos* dans le cerveau montre que les structures de l'« *extended amygdala* » (AcbS, BNST, CeA), le LS, CA1 et le BIA pourraient spécifiquement sous-tendre la composante motivationnelle du sevrage.

III.1. Corrélations avec les études comportementales

Nos résultats supportent de nombreuses études comportementales qui ont suggéré depuis longtemps que des structures cérébrales distinctes pourraient médier de manière spécifique les propriétés motivationnelles et somatiques du syndrome de sevrage des opiacés (pour revue : Koob *et al.*, 1992). En effet, des injections intracérébrales de méthylnaloxonium (un antagoniste opiacé qui ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique) ont révélé que l'Acb et l'amygdale sont des structures très sensibles pour induire une aversion de place conditionnée (Stinus *et al.*, 1990), alors que le LC et la PAG seraient plutôt impliqués dans l'expression des signes somatiques du sevrage des opiacés (Maldonado *et al.*, 1992). De plus, lorsqu'il est administré directement dans les ventricules cérébraux, le méthylnaloxonium est capable de précipiter un syndrome de sevrage, chez des rats morphino-

dépendants, relativement similaire à celui obtenu après une injection systémique de naloxone, bien que les symptômes « diarrhées » et « salivation » n'apparaissent pas, ce qui suggère que ces signes somatiques pourraient être médiés par un effet du sevrage au niveau périphérique (viscéral), et que les autres signes somatiques ainsi que l'aversion de place conditionnée pourraient être médiés au niveau central (Hand *et al.*, 1988; Stinus *et al.*, 1990; Maldonado *et al.*, 1992).

En accord avec ces données, notre analyse des valeurs de DE_{50} pour les différents indices comportementaux du sevrage des opiacés (voir Figure 17) suggère que des injections systémiques de doses de naloxone < 20 µg/kg sont capables d'induire de manière spécifique une aversion de place conditionnée ainsi que des signes qui sont plutôt reliés à un état aversif général (peur, stress, anxiété), alors que des symptômes tels que « diarrhées » et « salivation » sont sensibles à de plus fortes doses de naloxone. Cette analyse comportementale globale est en fait corrélée à notre étude cartographique de l'expression de *c-fos* qui montre que de nombreuses régions limbiques sont spécifiquement recrutées pour des doses de naloxone < 20 µg/kg, suggérant que ces structures pourraient sous-tendre la composante aversive et motivationnelle du sevrage des opiacés. De plus, les variations de l'expression de *c-fos* dans ces structures sont toujours accentuées lorsque les doses de naloxone augmentent, montrant que si ces régions cérébrales sont impliquées dans la composante motivationnelle du sevrage, leur activité reste fortement altérée au cours de l'expression d'un syndrome de sevrage « complet » (incluant l'ensemble de la symptomatologie) précipité par de plus fortes doses de naloxone. En accord avec ces données, les symptômes cliniques du sevrage chez l'homme semblent apparaître selon un continuum temporel bien précis, avec tout d'abord l'émergence d'un état de malaise aversif général (composante motivationnelle) qui perdure, alors que les signes somatiques apparaissent par la suite de manière progressive.

Par ailleurs, l'injection périphérique de méthylnaloxonium chez des rats morphino-dépendants est également capable d'induire l'expression de la protéine c-Fos dans diverses régions cérébrales (Hamlin *et al.*, 2001). De manière intéressante, les inductions de c-Fos détectées en réponse à un sevrage de la morphine « périphérique » (méthylnaloxonium en injection systémique, 5 mg/kg) dans le CeA, l'AcbS, la VTA, le NTS et le PVH sont moins intenses que les inductions obtenues en réponse à un sevrage « systémique » (injection systémique d'une forte dose de naloxone, 5 mg/kg), ce qui suggère qu'une partie de l'induction observée dans ces structures au cours du sevrage « systémique » précipité par la naloxone pourrait être attribuée à un effet spécifique au niveau central. En accord avec ces données, des injections périphériques de méthylnaloxonium sont incapables d'induire une aversion de place conditionnée (Hand *et al.*, 1988). Par conséquent, nous proposons que le pattern d'expression de *c-fos* que nous détectons spécifiquement dans l'AcbS, le LS, le BNST, CA1 et l'amygdale avec les plus faibles doses de naloxone pourrait refléter exclusivement le traitement au niveau central de l'état affectif négatif et motivationnel du syndrome de sevrage de la morphine (Hand *et al.*, 1988; Gracy *et al.*, 2001; Hamlin *et al.*, 2001). L'accroissement des variations de l'ARNm *c-fos* mesurée dans ces régions ainsi que les inductions détectées dans les autres territoires cérébraux en réponse à l'administration de plus fortes doses de naloxone pourrait alors résulter de l'activation d'afférences sensorielles en provenance de la périphérie (Hamlin *et al.*, 2001).

L'AcbS, le BNST et le CeA, dans lesquels l'ARNm *c-fos* est induit par l'injection de très faibles doses de naloxone, représentent les principaux constituants de l'« *extended amygdala* » (Alheid & Heimer, 1988; Heimer *et al.*, 1997a; Heimer *et al.*, 1997b). Ces structures limbiques sous-corticales sont fortement interconnectées et sous le contrôle neuromodulateur de projections ascendantes dopaminergiques et noradrénergiques en provenance respectivement de la VTA et du NTS (Phelix *et al.*, 1992; Freedman & Cassell, 1994; Delfs *et al.*, 1998; Aston-Jones *et al.*, 1999a). Divers auteurs ont proposé que les structures de l'« *extended amygdala* » pourraient être impliquées dans les phénomènes addictifs (pour revues : Koob & Le Moal, 1997; Rodriguez de Fonseca & Navarro, 1998; Di Chiara *et al.*, 1999), et les connexions neuronales intrinsèques et extrinsèques de cette macrostructure sont capables de rendre compte de son implication dans le traitement d'informations d'ordre affectives et émotionnelles (Alheid & Heimer, 1988; Schmued, 1994). Nous montrons ici que les structures de l'« *extended amygdala* » sont spécifiquement recrutées au cours du sevrage précipité par de faibles doses de naloxone, ce qui est en accord avec l'idée que ce réseau limbique pourrait représenter un substrat important pour la modulation des propriétés motivationnelles du sevrage des opiacés.

III.2. Réponses *c-fos* opposées entre le noyau central et le noyau basolatéral de l'amygdale

L'effet le plus intéressant, en réponse au sevrage précipité par des doses croissantes de naloxone, est observé dans les deux noyaux principaux de l'amygdale. Nous montrons que les modifications de l'expression de l'ARNm *c-fos* sont effectivement dose-dépendantes, mais opposées entre le CeA et le BIA au cours du sevrage de la morphine. En effet, alors que le nombre de neurones *c-fos* positifs est augmenté dans le CeA, il est au contraire diminué dans le BIA. Ces effets sont détectés dès la plus faible dose de naloxone (i.e. 7.5 µg/kg) et par conséquent doivent être liés aux propriétés motivationnelles du sevrage des opiacés. De plus, l'induction de l'ARNm *c-fos* mesurée dans les neurones GABAergiques du CeA apparaît restreint à la partie capsulaire (CeC) pour les faibles doses de naloxone, alors que la partie latérale (CeL) n'est recrutée que pour les plus fortes doses de naloxone. Ces données sont en accord avec le fait que le CeC partage des propriétés communes sur le plan de son architecture anatomique et neurochimique avec l'AcbS (qui est également recruté dès l'injection de faibles doses de naloxone), alors que le CeL s'apparente plus à l'AcbC (qui au contraire n'est recruté que pour les fortes doses) (Cassell *et al.*, 1999). De manière intéressante, la sensibilité particulière de notre technique d'hybridation *in situ* nous a permis de montrer pour la première fois que le syndrome de sevrage de la morphine est capable de provoquer non seulement des inductions de l'expression du gène *c-fos*, mais également des inhibitions, comme démontré ici par la diminution dose-dépendante mesurée dans le BIA. Ce résultat suggère que les événements neurobiologiques associés au sevrage des opiacés pourraient également impliquer des processus inhibiteurs dans des régions cérébrales spécifiques.

Le BIA est une structure « quasi-corticale », dans laquelle des interneurons GABAergiques inhibiteurs contrôlent l'activité électrique de neurones efférents glutamatergiques (Pitkanen *et al.*, 1997). Les neurones efférents excitateurs du BIA projettent entre autre sur les neurones de type

GABAergiques du CeA, en relayant en majorité au travers d'un cluster d'interneurones inhibiteurs formant le noyau intercalé de l'amygdale (ITC pour « *intercalated cell masses* ») (Millhouse, 1986; Nitecka & Ben-Ari, 1987; Cassell *et al.*, 1999). L'analyse phénotypique des neurones marqués dans le BIA montre que la diminution du nombre de neurones *c-fos* positifs induite par la naloxone affecte principalement la population non-GABAergique (c'est-à-dire, la population glutamatergique). Par conséquent, l'intense induction de l'ARNm *c-fos* détectée dans le CeA pourrait en partie résulter d'une désinhibition de type « *feed-forward* ». En effet, la diminution de l'activité des neurones efférents du BIA pourrait inhiber l'activité des neurones de l'ITC, et ainsi provoquer une perte du contrôle tonique inhibiteur sur les neurones du CeA.

L'amygdale est une structure clé pour l'expression de comportements liés à des phénomènes émotionnels, et en particulier aux événements possédant une forte connotation aversive (Le Doux, 2000). Le CeA et le BIA ont été impliqués de manière extensive et différentielle dans les processus d'apprentissage associatifs qui permettent d'attribuer une valeur affective particulière (« *incentive-salience* ») à des stimuli environnementaux associés aux effets des drogues d'abus (pour revues : Everitt *et al.*, 1999; Cardinal *et al.*, 2002; Everitt *et al.*, 2003). Par ailleurs, nous avons montré que le LS et le champ CA1 de l'hippocampe sont également recrutés dès les faibles doses de naloxone. De manière intéressante, ces structures limbiques sont interconnectées avec l'amygdale et ont également été impliquées dans les processus de conditionnement possédant une connotation émotionnelle (Desmedt *et al.*, 1999; Hall *et al.*, 2000, 2001b). Ainsi, les patterns d'expression de *c-fos* opposés dans l'amygdale, ainsi que l'induction détectée dans les autres structures de l'« *extended amygdala* », le LS et CA1 pourraient en partie refléter la mise en place de processus d'apprentissage associatif, qui sont particulièrement impliqués dans l'aversion de place conditionnée induite par la naloxone.

III.3. Signification fonctionnelle de l'expression de l'ARNm *c-fos*

Les IEGs sont des facteurs de transcription inductibles dont l'expression est modifiée suite à des stimulations diverses et variées, autorisant leur utilisation comme marqueurs de réactivité neuronale (pour revues : Morgan & Curran, 1995; Herdegen & Leah, 1998; Kovacs, 1998). Cependant, la relation causale entre expression des produits du gène *c-fos* et activité électrique neuronale n'a pas encore été établie de façon claire, même s'il pourrait exister une bonne corrélation dans certaines structures. Par exemple, il est confirmé que l'activité électrique des neurones du LC est fortement augmentée au cours du sevrage des opiacés (Rasmussen *et al.*, 1990), et nous montrons ici que tous les neurones noradrénergiques du LC expriment l'ARNm *c-fos* de manière très intense lors du sevrage de la morphine précipité par la naloxone (voir Figure 22).

En revanche, même si l'activité des neurones mésolimbiques dopaminergiques est fortement diminuée au cours du sevrage des opiacés (Diana *et al.*, 1995; Georges & Aston-Jones, 2003), et que l'excitabilité des interneurones GABAergiques est au contraire augmentée (Bonci & Williams, 1997), la relation avec l'expression du marqueur *c-fos* n'a pas encore été démontrée clairement dans cette structure, probablement à cause du niveau basal de l'ARNm *c-fos* qui est particulièrement faible dans

ce noyau (cf. § III.4., ci-dessous). Ces questions n'ont de toute façon pas été analysées en détail au cours du sevrage, et en particulier dans les autres structures cérébrales.

III.4. Mécanismes potentiels pour l'expression de *c-fos* dans les structures recrutées par le sevrage précipité par des faibles doses de naloxone

Les récepteurs opioïdes sont couplés négativement à l'adénylate cyclase par l'intermédiaire des protéines $G_{i/o}$ (pour revues : Mansour *et al.*, 1995a; Minami & Satoh, 1995; Law & Loh, 1999) et peuvent être localisés en position pré- ou postsynaptique. Le blocage des récepteurs opioïdes au niveau central par la naloxone peut par conséquent aboutir, soit à une facilitation de la transmission présynaptique, soit à une désinhibition des neurones au niveau postsynaptique (Duggan & North, 1983), et pourrait provoquer dans les deux cas une augmentation de l'expression de l'ARNm *c-fos*. De plus, aux doses utilisées dans notre étude, la naloxone se fixe préférentiellement sur les récepteurs opioïdes de type μ (Law & Loh, 1999). Ainsi, l'expression de l'ARNm *c-fos* induite par la naloxone devrait être détectée en majorité dans les structures possédant de grandes densités de récepteurs μ . Cependant, la distribution des récepteurs opioïdes de type μ dans le système nerveux central du rat (Mansour *et al.*, 1995a) ne peut que partiellement rendre compte de nos résultats. Par exemple, très peu de récepteurs opioïdes ont été décrits dans le CeA (Mansour *et al.*, 1995a), qui est néanmoins la structure la plus sensible aux injections de naloxone dans nos conditions expérimentales. Par conséquent, les variations de l'ARNm *c-fos* dans une structure cérébrale donnée au cours du sevrage précipité par la naloxone ne peut pas être strictement reliée à son contenu en sites de liaison pour les récepteurs opioïdes.

D'autres mécanismes pourraient impliquer l'intervention de processus modulateurs interactifs entre la dopamine et la noradrénaline au sein de l'« *extended amygdala* », qui semblent représenter des phénomènes importants dans l'expression des propriétés motivationnelles du sevrage des opiacés (Pothos *et al.*, 1991; Delfs *et al.*, 2000). De plus en plus de données proposent que les neurones noradrénergiques du LC ne seraient pas impliqués dans la composante aversive du syndrome de sevrage (Caillé *et al.*, 1999; Delfs *et al.*, 2000). Par conséquent, l'expression de l'ARNm *c-fos* induite par l'administration de faibles doses de naloxone chez des rats morphino-dépendants, en particulier dans les structures de l'« *extended amygdala* », pourrait être en partie pilotée par l'activité d'afférences dopaminergiques et noradrénergiques en provenance respectivement de la VTA et du NTS. En effet, les neurones noradrénergiques du groupe A2 (NTS) sont fortement recrutés lors du sevrage de la morphine (Harris & Aston-Jones, 1993; Aston-Jones *et al.*, 1999a; Delfs *et al.*, 2000). De plus, chez des rats en sevrage de la morphine aigu, l'activité des neurones dopaminergiques mésolimbiques est profondément diminuée (Diana *et al.*, 1995; Georges & Aston-Jones, 2003), ainsi que la libération de dopamine dans le noyau accumbens (Acquas *et al.*, 1991; Pothos *et al.*, 1991; Acquas & Di Chiara, 1992; Rossetti *et al.*, 1992). Bien que tous ces résultats aient été obtenus lors d'un sevrage précipité par de fortes doses d'antagonistes opiacés, des données comportementales suggèrent que les variations de l'activité des systèmes monoaminergiques centraux pourraient être

préférentiellement impliquées dans l'aspect motivationnel du sevrage (Crippens & Robinson, 1994; Diana *et al.*, 1999; Delfs *et al.*, 2000).

Cependant, même si les variations de l'expression de l'ARNm *c-fos* que nous détectons d'une manière globale dans la VTA et le NTS sont dose-dépendantes, elles ne sont pas très intenses et l'analyse statistique ne montre pas de modifications significatives pour les plus faibles doses de naloxone. Néanmoins, nous ne pouvons pas exclure une participation possible de ces noyaux à la composante motivationnelle du sevrage des opiacés. En effet, si les neurones dopaminergiques et noradrénergiques sont responsables des modifications que nous détectons dans l'« *extended amygdala* » une heure après les injections de naloxone, il est possible que les variations de l'ARNm *c-fos* puissent apparaître plus rapidement dans la VTA et le NTS. Il semble donc nécessaire d'analyser le déroulement temporel de la réactivité de ces structures au cours du sevrage précipité par la naloxone, à des temps plus courts, et en utilisant – en parallèle de *c-fos* – d'autres marqueurs de réactivité neuronale comme par exemple phospho-CREB ou encore certaines MAP kinases (phospho-ERK), dont l'activité est modifiée plus précocement que celle de l'ARNm *c-fos*.

En ce qui concerne la VTA, notre analyse de l'expression de l'ARNm *c-fos* dans des neurones phénotypiquement identifiés montre que la majorité des neurones GABAergiques présentent une induction de l'ARNm *c-fos* dose-dépendante, et qui est significative dès 15 µg/kg de naloxone. Ces données montrent bien que la réactivité d'une population neuronale particulière de la VTA peut être significativement modifiée lors d'un sevrage précipité par l'injection de faibles doses de naloxone. Il a d'ailleurs été suggéré que l'augmentation de l'activité des interneurons GABAergiques de la VTA au cours du sevrage de la morphine pourrait provoquer une inhibition de l'activité des neurones dopaminergiques (Bonci & Williams, 1997). En accord avec cette hypothèse, nous montrons ici que la population GABAergiques de la VTA s'active progressivement au cours du sevrage précipité par des doses croissantes de naloxone, puisqu'une induction de l'expression de *c-fos* est détectée dans environ 23, 32, 43 et 72% des neurones de cette population, après respectivement 7.5, 15, 30 et 120 µg/kg de naloxone. Cependant, si les neurones GABAergiques de la VTA sont bien activés au cours du sevrage des opiacés, le faible niveau basal d'expression de l'ARNm *c-fos* dans ce noyau ne nous a pas permis de détecter une inhibition dans les neurones dopaminergiques. En accord avec nos données, une étude récente a montré que l'expression de c-Fos est augmentée dans les neurones non-dopaminergiques, mais pas modifiée dans les neurones dopaminergiques de la VTA au cours du sevrage de la morphine précipité de manière aiguë par la naltrexone, alors que la transcription médiée par la séquence consensus CRE (« *cAMP response element* ») est diminuée préférentiellement dans les neurones dopaminergiques (Shaw-Lutchman *et al.*, 2002). L'ensemble de ces résultats suggère que dans la VTA, *c-fos* pourrait ne pas être le marqueur le plus approprié pour détecter l'inhibition de l'activité des neurones dopaminergiques.

De manière intéressante, notre analyse phénotypique des neurones recrutés dans la VTA montre également qu'une faible sous-population de neurones dopaminergiques présente une induction de *c-fos* au cours du sevrage aigu précipité par la naloxone (environ 13%). Comme l'activité du système dopaminergique qui projette vers l'Acb semble inhibée au cours du sevrage de la morphine (Acquas *et al.*, 1991; Pothos *et al.*, 1991; Acquas & Di Chiara, 1992; Rossetti *et al.*, 1992; Diana *et al.*, 1995;

Diana *et al.*, 1999; Georges & Aston-Jones, 2003), il est peu probable que cette faible proportion de neurones qui présente une induction de *c-fos* projette vers le complexe striatal, mais plutôt vers d'autres structures limbiques comme le cortex préfrontal ou encore l'amygdale. En effet, ces régions limbiques reçoivent également des projections dopaminergiques en provenance de la VTA, mais dans une plus faible proportion que l'Acb (pour revues : Björklund & Lindvall, 1984, 1986). En accord avec notre hypothèse, il a été montré que les niveaux de dopamine extracellulaire dans le cortex préfrontal étaient augmentés au cours du sevrage des opiacés (Bassareo *et al.*, 1995). L'ensemble de ces données indique que des sous-populations de neurones dopaminergiques mésolimbiques, projetant dans des structures cérébrales différentes, pourraient réagir de façon opposée en réponse au sevrage des opiacés.

Enfin, de nombreuses neuroadaptations cellulaires et moléculaires mises en place au cours de la dépendance et du sevrage ont été décrites dans les structures de l'« *extended amygdala* » et sont capables d'influencer le fonctionnement du système opioïde endogène mais également des autres systèmes de neurotransmetteurs (pour revues : Koob & Le Moal, 1997; Nestler & Aghajanian, 1997; Williams *et al.*, 2001). Ces modifications adaptatives neurochimiques ont été liées au fait que l'aspect motivationnel du sevrage peut perdurer, même après une longue période d'abstinence, et pourraient également contribuer au pattern spécifique d'expression de *c-fos* que nous détectons dans ces structures, conduisant l'ensemble du système dans un état excessivement sensible au sevrage de la morphine précipité par la naloxone.

IV. CONCLUSIONS

En conclusion, nos résultats montrent que le sevrage de la morphine précipité par de très faibles doses de naloxone est capable de modifier l'expression de l'ARNm de *c-fos* dans un réseau d'aires limbiques spécifiques et fortement interconnectées, incluant les structures de l'« *extended amygdala* » (AcbS, BNST et CeA), le septum latéral, CA1 et le noyau basolatéral de l'amygdale. Nous proposons que ce pattern spécifique d'expression pourrait révéler le traitement par le cerveau des propriétés motivationnelles du sevrage des opiacés.

En revanche, l'injection systémique de doses plus fortes de naloxone est nécessaire pour recruter de nombreuses autres structures cérébrales chez le rat morphino-dépendant, qui, par conséquent, doivent être préférentiellement impliquées dans l'expression des symptômes somatiques apparaissant de façon manifeste au cours du syndrome de sevrage des opiacés. La corrélation entre l'analyse de l'effet-dose de la naloxone sur les multiples index comportementaux du sevrage et le pattern d'expression de *c-fos* contribue ainsi à mieux délimiter les substrats neurobiologiques qui sous-tendent l'expression des différentes composantes du syndrome de sevrage des opiacés.

Chez les toxicomanes, la présentation de stimuli environnementaux qui ont été précédemment associés au sevrage des opiacés est capable d'induire un état affectif particulier, le « *craving* », au cours duquel les individus ressentent un puissant désir de consommer à nouveau la drogue (Wikler,

1973; Jaffe, 1990). Chez l'animal morphino-dépendant, cet état motivationnel peut être révélé entre autre dans le modèle d'aversion de place conditionnée (Mucha, 1987; Higgins & Sellers, 1994), dans lequel des stimuli environnementaux à l'origine « neutres » sont capables d'acquérir des propriétés incitatives propres (motivationnelles) par association répétée avec les effets aversifs du sevrage, et par la suite de contrôler le comportement de l'animal (éviter des stimuli associés précédemment au sevrage). Ainsi, pour aller plus loin dans la caractérisation de la composante motivationnelle du sevrage, nous avons analysé les substrats neurobiologiques qui sont recrutés lors de la simple réexposition d'animaux conditionnés à des stimuli environnementaux associés de façon répétée au sevrage des opiacés. Cette étude constitue le Chapitre 2 de ce manuscrit.

✎

*Le travail présenté dans ce chapitre a donné lieu à la publication d'un article dans European Journal of Neurosciences : Frenois F., Cador M., Caillé S., Stinus L., Le Moine C. (2002) Neural correlates of the motivational and somatic components of naloxone-precipitated morphine withdrawal. **Eur J Neurosci** (16-7) 1377-1389.*

✎

FIGURES DU CHAPITRE 1

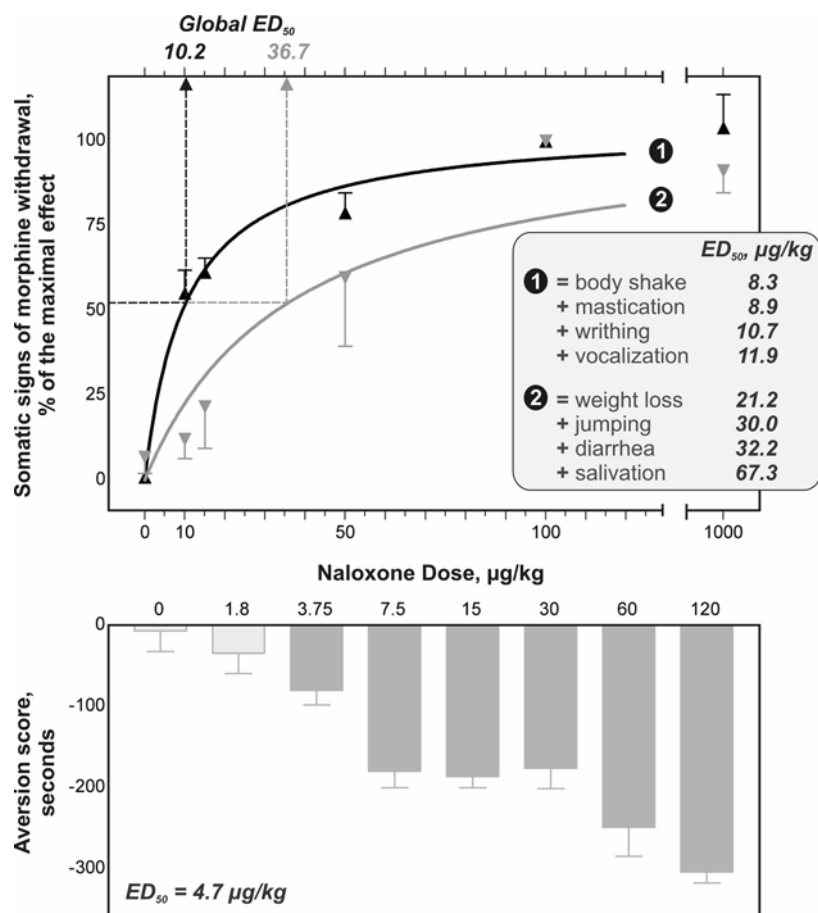


Figure 17. Analyse comportementale globale du syndrome de sevrage de la morphine précipité par la naloxone.

Le diagramme du haut (courbes de régression) montre l'expression de 2 groupes de signes somatiques du sevrage (moyennes \pm SEM) en réponse à l'injection de doses croissantes de naloxone (0, 10, 15, 50, 100 et 1000 $\mu\text{g/kg}$). Le premier groupe est représenté par la courbe noire qui s'ajuste aux valeurs moyennes des signes somatiques ayant une $DE_{50} < 20 \mu\text{g/kg}$ (« *body shake* », « *mastication* », « *writhing* » et « *vocalization* »). Le deuxième groupe est représenté par la courbe grise qui s'ajuste aux valeurs moyennes des signes somatiques ayant une $DE_{50} > 20 \mu\text{g/kg}$ (« *weight loss* », « *jumping* », « *diarrhea* » et « *salivation* »). Les valeurs globales de DE_{50} correspondant respectivement au premier et au deuxième groupe de signes sont 10.2 et 36.7 $\mu\text{g/kg}$. Le diagramme du bas (histogrammes) montre l'expression de l'aversion de place conditionnée induite par des doses croissantes de naloxone (0, 1.8, 3.75, 7.5, 15, 30, et 120 $\mu\text{g/kg}$). Chaque histogramme représente le score d'aversion (moyennes \pm SEM) pour le compartiment du « *Y-maze* » qui a été précédemment associé à une injection de naloxone pendant la phase de conditionnement (les histogrammes gris foncés représentent les scores d'aversion statistiquement significatifs).

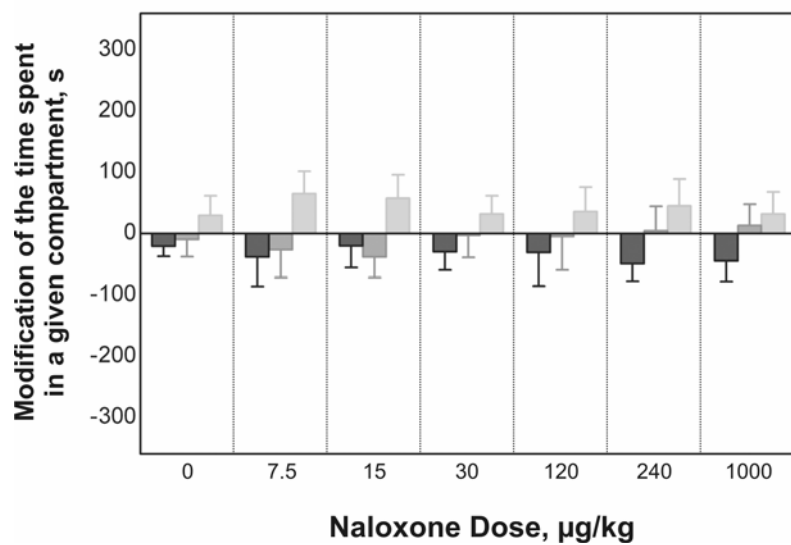


Figure 18. Effet de doses croissantes de naloxone sur l'aversion de place conditionnée, chez des rats placebos (sans morphine).

L'aversion de place conditionnée a été induite par les doses suivantes de naloxone : 0, 7.5, 15, 30, 120, 240 et 1000 µg/kg. Chaque histogramme représente la modification du temps passé dans un compartiment donné pendant la phase de test par rapport à la phase de pré-conditionnement (moyennes \pm SEM). Histogrammes noirs, compartiment associé à la naloxone (cs+); histogrammes gris foncés, compartiment associé au saline (cs-); histogrammes gris clairs, compartiment neutre. Aucune des doses de naloxone utilisées n'est capable d'induire une aversion de place conditionnée chez des rats placebos (« *Wilcoxon matched pairs test* » : n.s. pour tous les compartiments quelle que soit la dose de naloxone utilisée).

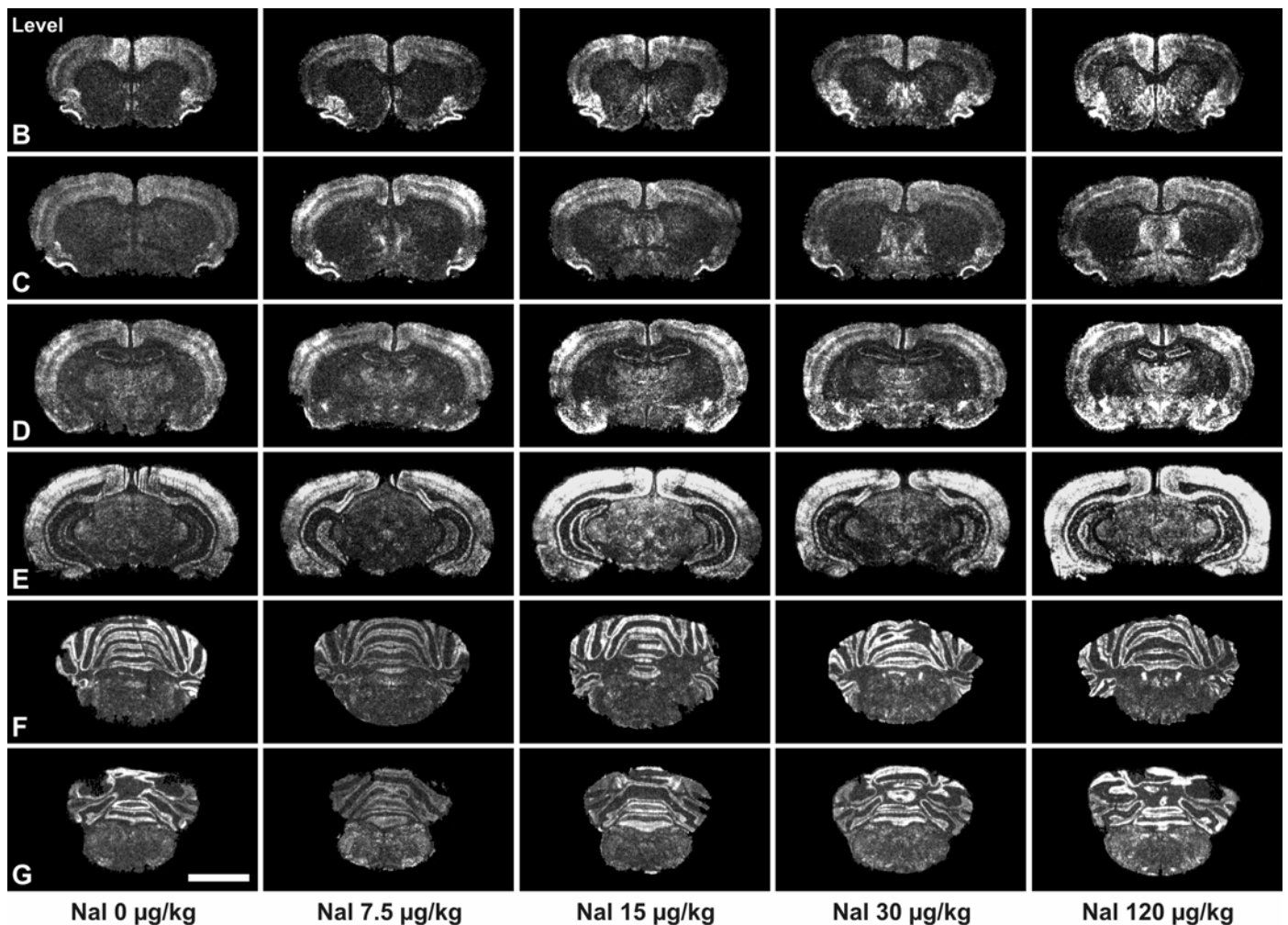


Figure 19. Cartographie de l'expression de l'ARNm *c-fos* dans l'ensemble du cerveau après un sevrage précipité par des doses croissantes de naloxone.

Images négatives de film rayon X après hybridation *in situ* montrant l'expression de l'ARNm *c-fos* selon l'axe rostro-caudal. Les niveaux B–G correspondent aux niveaux anatomiques décrits dans la Figure 16. Le sevrage de la morphine a été précipité par des doses croissantes de naloxone (0, 7.5, 15, 30 et 120 µg/kg). Les territoires montrant une expression de l'ARNm *c-fos* apparaissent en blanc. Les niveaux d'expression de l'ARNm *c-fos* sont augmentés à partir des doses faibles de naloxone (7.5 ou 15 µg/kg) dans le noyau accumbens (B), le septum latéral (C), Le BNST (C), et le CeA (D). L'administration de doses plus fortes de naloxone (30 ou 120 µg/kg) provoque une induction de l'ARNm *c-fos* dans un grand nombre d'autres structures, incluant le CPu, (B, C), les aires thalamiques et hypothalamiques (D, E), le LC (F) et le NTS (G). Barre d'échelle, 5 mm.

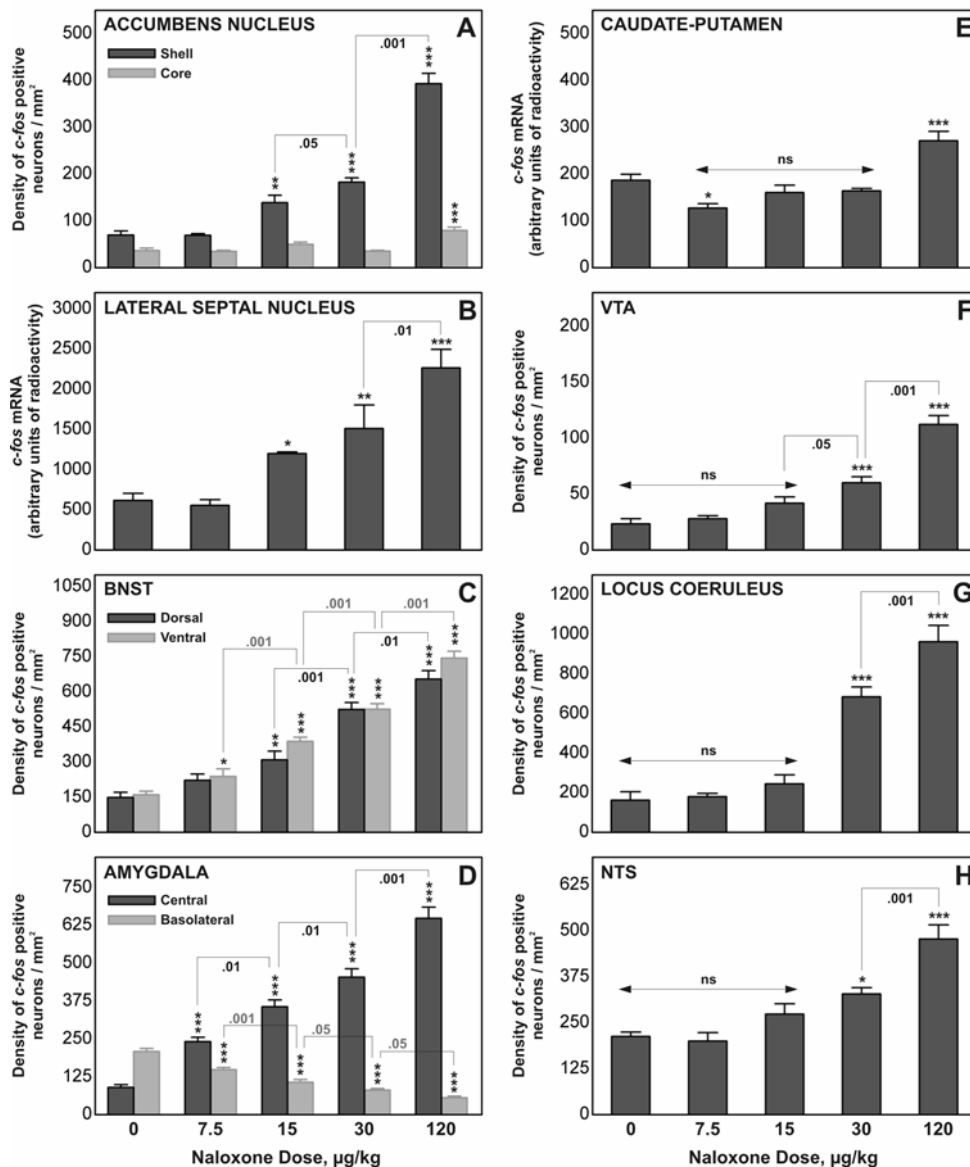


Figure 20. Mesures quantitatives de l'expression de l'ARNm *c-fos* après un sevrage précipité par des doses croissantes de naloxone.

(A–H) Histogrammes représentant les variations de l'expression de l'ARNm *c-fos* en fonction de doses croissantes de naloxone (0, 7.5, 15, 30 et 120 µg/kg) mesurées dans différentes structures cérébrales. En fonction du type d'analyse (densitométrie sur film rayon X ou comptage de neurones), chaque histogramme représente les moyennes ± SEM des valeurs de densité optique (B et E) ou du nombre de neurone *c-fos* positif par mm² (A, C, D et F–H). Les niveaux d'ARNm *c-fos* sont augmentés de façon dose-dépendante à partir des faibles doses de naloxone (7.5 ou 15 µg/kg) dans les structures limbiques de l'« *extended amygdala* » (AcbS, BNSTd, BNSTv et CeA) ainsi que dans le LS, mais diminués dans le BIA. En revanche, des doses plus fortes de naloxone (30 ou 120 µg/kg) provoquent une augmentation de l'ARNm de *c-fos* dans d'autres structures (CPu, VTA, LC et NTS). Une ANOVA a été réalisée pour chaque structure [$P < 0.0001$ pour l'AcbS $F_{(4,23)} = 92.78$, l'AcbC $F_{(4,23)} = 18.93$, le LS $F_{(4,24)} = 15.22$, le BNSTd $F_{(4,24)} = 43.81$, le BNSTv $F_{(4,24)} = 85.09$, le CeA $F_{(4,24)} = 69.50$, le BIA $F_{(4,24)} = 58.71$, le CPu $F_{(4,24)} = 16.21$, la VTA $F_{(4,23)} = 42.19$, le LC $F_{(4,23)} = 49.29$ et le NTS $F_{(4,20)} = 19.42$], suivie du test *post hoc* « Newman-Keuls multiple comparison test » : *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ versus contrôle (Nal 0 µg/kg). Les valeurs de P significatives entre chaque dose de naloxone sont représentées sur les graphiques (« .05 », $P < 0.05$; « .01 », $P < 0.01$; « .001 », $P < 0.001$).

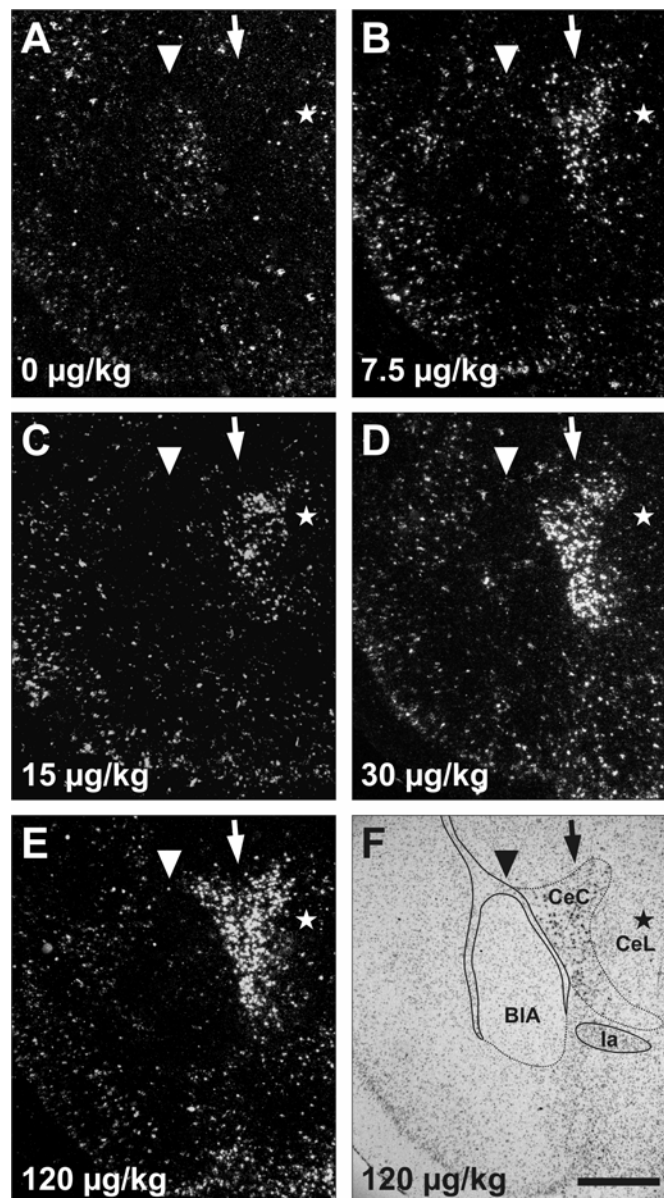


Figure 21. Expression de l'ARNm *c-fos* dans l'amygdale après un sevrage précipité par des doses croissantes de naloxone.

(A) Microphotographie en fond noir montrant le niveau basal d'expression de l'ARNm *c-fos* dans l'amygdale de rats contrôles. (B–E) Microphotographies en fond noir montrant l'expression de l'ARNm *c-fos* dans l'amygdale après l'injection de doses croissantes de naloxone. Les neurones marqués pour l'ARNm *c-fos* apparaissent en blanc. Les têtes de flèches blanches pointent sur le noyau basolatéral de l'amygdale (BIA) et les flèches blanches pointent sur le noyau central de l'amygdale (CeA). Le BIA montre un niveau basal d'expression de *c-fos* plus élevé que le CeA. L'expression de l'ARNm *c-fos* augmente de façon dose-dépendante dans le CeA, mais diminue dans le BIA, et ceci, à partir de la plus faible dose de naloxone utilisée (i.e. 7.5 µg/kg). L'augmentation de l'expression de *c-fos* induite par la naloxone dans le CeA affecte principalement la partie capsulaire (CeC), alors que le marquage dans la partie latérale (CeL) est relativement faible (l'étoile blanche indique le CeL). (F) Microphotographie en fond clair correspondant à la coupe montrée en E, et délimitant les différentes sous-divisions quantifiées dans l'amygdale (la, noyau intercalé de l'amygdale). Barre d'échelle, 1 mm.

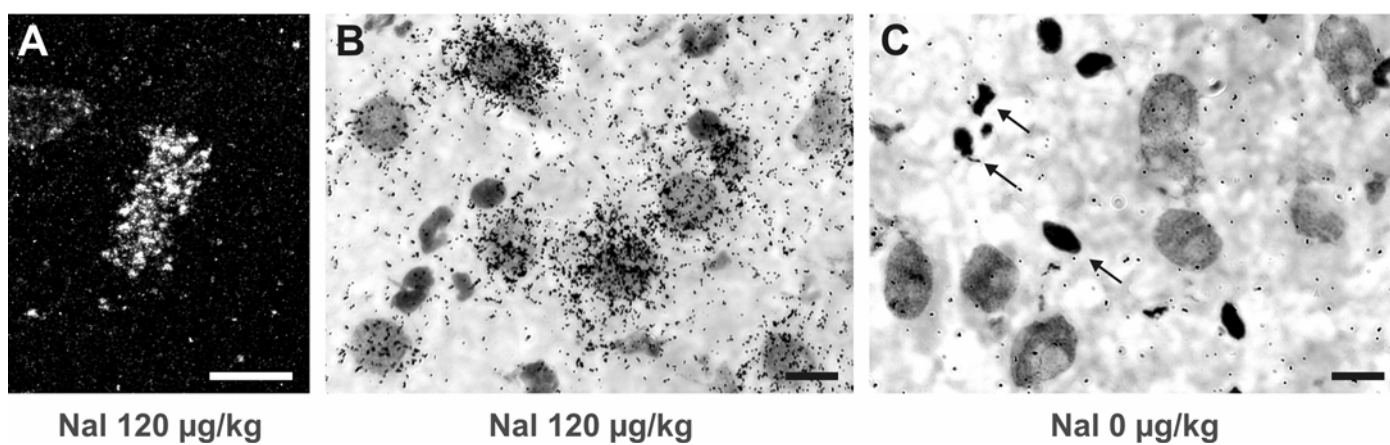


Figure 22. Expression de l'ARNm *c-fos* induite par la naloxone au niveau du locus coeruleus. (A) Microphotographie en fond noir montrant la forte induction de l'ARNm *c-fos* dans le locus coeruleus après un syndrome de sevrage de la morphine précipité par 120 µg/kg de naloxone. Les neurones montrant une induction de *c-fos* apparaissent en blanc. (B et C) Microphotographie en fort grossissement illustrant l'induction de l'ARNm *c-fos* (grains d'argent) dans l'ensemble des neurones du LC (marquage gris clair) suite à l'injection de 120 µg/kg de naloxone (B) par rapport aux rats contrôles (C). Les petits noyaux marqués en gris foncé correspondent aux cellules gliales (flèches dans C). Barres d'échelle, 500 µm (A), 20 µm (B et C).

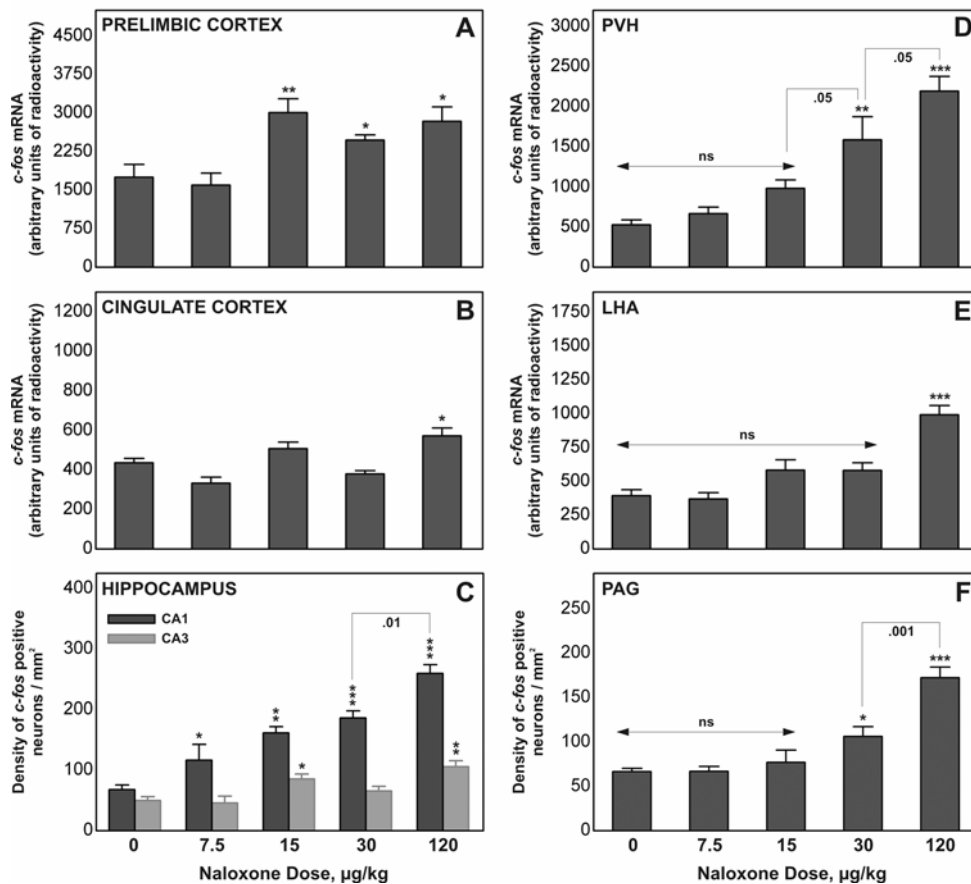


Figure 23. Quantification de l'expression de l'ARNm *c-fos* induite par la naloxone dans les aires corticales et hypothalamiques, et dans l'hippocampe et la substance grise périaqueducatale.

Histogrammes représentant les variations de l'expression de l'ARNm *c-fos* en fonction de doses croissantes de naloxone (0, 7.5, 15, 30 et 120 µg/kg) dans les cortex prélimbique (A) et cingulaire (B), les champs CA1 et CA3 de l'hippocampe (C), le PVH (D), la LHA (E) et la PAG (F). En fonction du type d'analyse (densitométrie sur film rayon X ou comptage de neurones), chaque histogramme représente les moyennes ± SEM des valeurs de densité optique (A, B, D et E) ou du nombre de neurone *c-fos* positif par mm² (C et F). De fortes doses des naloxone (30 ou 120 µg/kg) induisent l'expression de l'ARNm *c-fos* dans les noyaux hypothalamiques et la PAG. Dans les aires corticales et CA3, les variations de l'expression de l'ARNm *c-fos* ne sont pas reliées aux doses croissantes de naloxone, alors que les niveaux d'expression de *c-fos* sont augmentés de façon dose dépendante à partir de 7.5 µg/kg dans CA1. Une ANOVA a été réalisée pour chaque structure [$P < 0.0001$ pour CA1 $F_{(4,20)} = 21.74$, la LHA $F_{(4,23)} = 18.47$, le PVH $F_{(4,24)} = 16.34$, la PAG $F_{(4,21)} = 18.95$ et le CgC $F_{(4,24)} = 10.67$; $P = 0.0006$ pour le PIC $F_{(4,24)} = 7.21$; $P = 0.0004$ pour CA3 $F_{(4,20)} = 8.36$], suivie du test *post hoc* « Newman-Keuls multiple comparison test » : *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ versus contrôle (Nal 0 µg/kg). Les valeurs de P significatives entre chaque dose de naloxone sont représentées sur les graphiques (« .05 », $P < 0.05$; « .01 », $P < 0.01$; « .001 », $P < 0.001$).

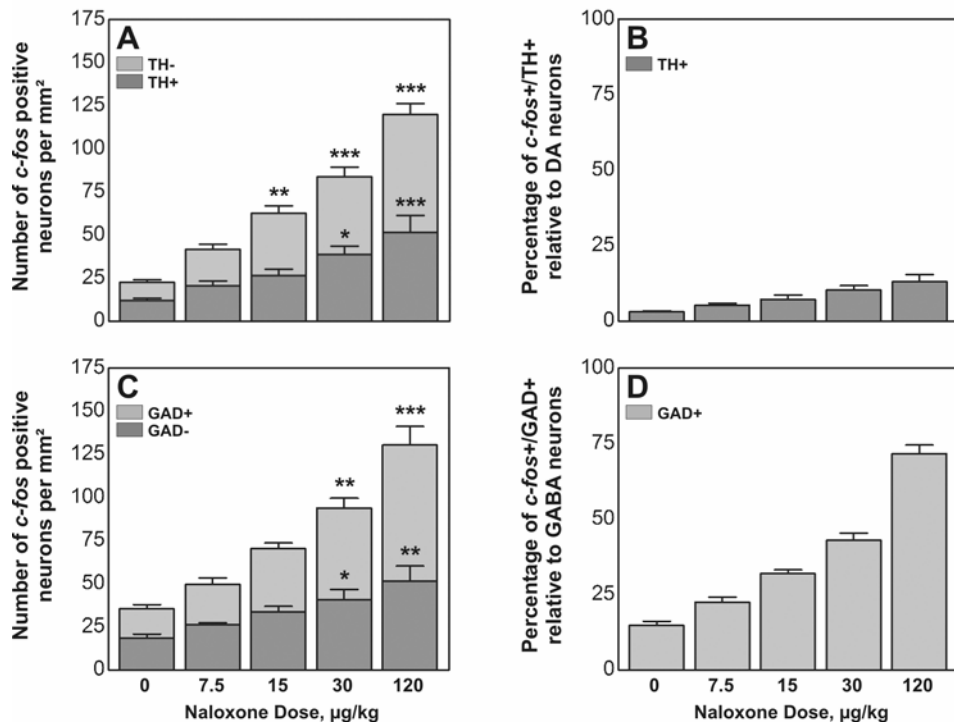


Figure 24. Mesure quantitative de l'expression de l'ARNm *c-fos* induite par des doses croissantes de naloxone dans des neurones phénotypiquement identifiés de la VTA.

(A et C) Histogrammes cumulatifs représentant les moyennes \pm SEM de la densité de neurones *c-fos* positifs par mm² en fonction de doses croissantes de naloxone (0, 7.5, 15, 30 et 120 µg/kg) dans les neurones TH+ (A) et GAD- (C) (histogramme gris foncé), et dans les neurones TH- (A) et GAD+ (C) (histogramme gris clair). Le nombre total de neurone *c-fos* positif est représenté par la somme des histogrammes gris foncé et gris clair. De manière générale, une augmentation dose-dépendante de l'expression de *c-fos* est mesurée mais elle n'est significative qu'à partir de la dose 30 µg/kg de naloxone dans les neurones TH+ et les neurones GAD+ et GAD-, alors que dans les neurones TH- l'augmentation est significative à partir de 15 µg/kg. Une ANOVA a été réalisée pour chaque population neuronale [$P < 0.0001$ pour *c-fos*+/TH- $F_{(4,21)} = 24.39$, pour *c-fos*+/GAD+ $F_{(4,21)} = 17.29$; $P = 0.0003$ pour *c-fos*+/TH+ $F_{(4,21)} = 8.36$; $P = 0.0014$ pour *c-fos*+/GAD- $F_{(4,21)} = 6.50$], suivie du test *post hoc* « Newman-Keuls multiple comparison test » : *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ versus contrôle (Nal 0 µg/kg). (B et D) Pourcentage de neurones doublements marqués par rapport à la population totale TH+ (B) ou à la population totale GAD+ (D). Alors que seulement $13 \pm 2\%$ des neurones de la population TH+ expriment l'ARNm *c-fos* après 120 µg/kg de naloxone, la majorité des neurones GAD+ montre une induction de l'ARNm *c-fos* ($72 \pm 3\%$) dans cette même situation.

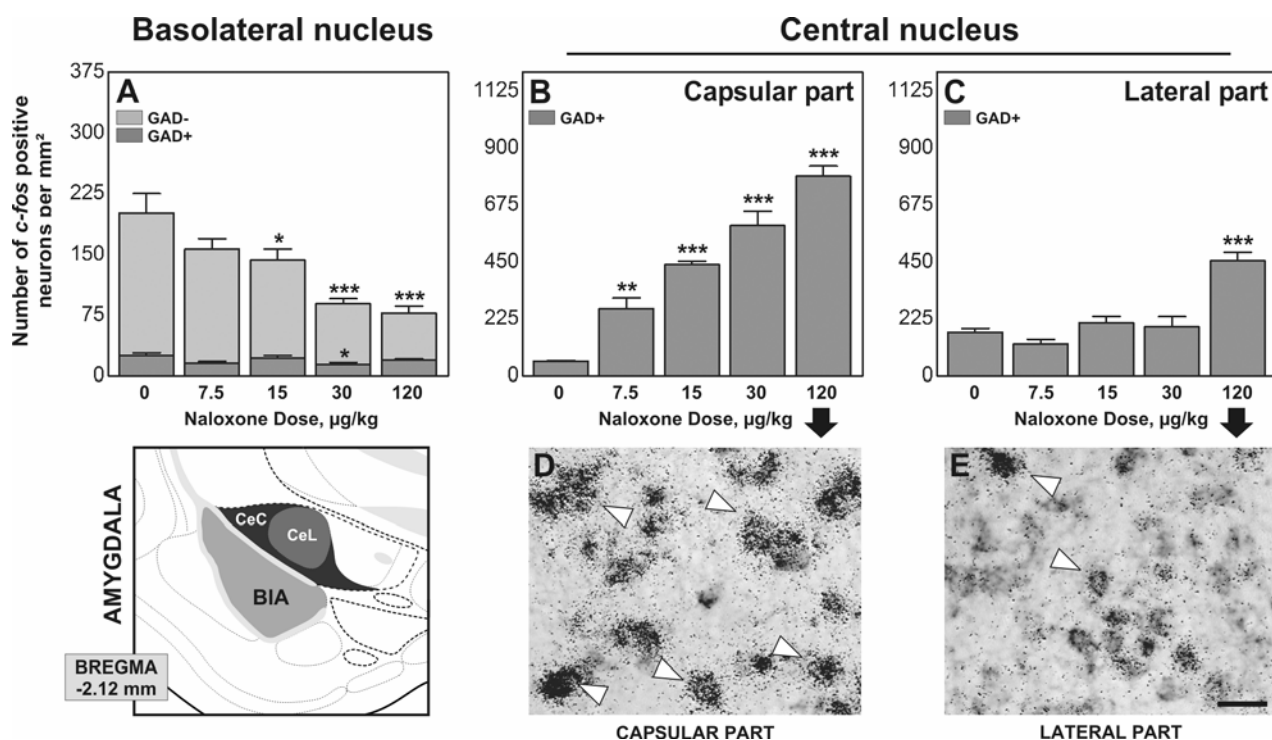


Figure 25. Quantification de l'expression de l'ARNm *c-fos* induite par des doses croissantes de naloxone dans des neurones phénotypiquement identifiés du BIA et des différentes sous-divisions du CeA (partie capsulaire et latérale).

(A) Histogramme cumulatifs représentant les moyennes \pm SEM de la densité de neurones *c-fos* positifs par mm² en fonction de doses croissantes de naloxone (0, 7.5, 15, 30 et 120 µg/kg) dans les neurones GAD+ (histogramme gris foncé) et dans les neurones GAD- (histogramme gris clair). Le nombre total de neurone *c-fos* positif est représenté par la somme des histogrammes gris foncé et gris clair. Le nombre de neurones *c-fos* positif est diminué de façon dose-dépendante mais uniquement dans la population GAD- (significatif à partir de 15 µg/kg de naloxone). Une ANOVA a été réalisée pour chaque population neuronale [$P < 0.0001$ pour *c-fos*+GAD- $F_{(4,24)} = 11.82$; $P = 0.0438$ pour *c-fos*+GAD+ $F_{(4,21)} = 2.89$], suivie du test *post hoc* « Newman-Keuls multiple comparison test » : *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$ versus contrôle (Nal 0 µg/kg). (B et C) Histogrammes représentant les moyennes \pm SEM de la densité de neurones *c-fos* positifs par mm² en fonction de doses croissantes de naloxone (0, 7.5, 15, 30 et 120 µg/kg) dans les neurones GAD+ du CeC (B) et du CeL (C). Les niveaux d'ARNm *c-fos* sont augmentés de façon dose-dépendante à partir de 7.5 µg/kg de naloxone dans le CeC. En revanche, seulement la dose maximale de naloxone (120 µg/kg) provoque une induction de *c-fos* dans le CeL. Une ANOVA a été réalisée pour chaque structure [$P < 0.0001$ pour le CeC $F_{(4,24)} = 52.35$ et le CeL $F_{(4,24)} = 20.54$], suivie du test *post hoc* « Newman-Keuls multiple comparison test » : **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ versus contrôle (Nal 0 µg/kg). (D et E) Microphotographies illustrant l'induction de l'ARNm *c-fos* dans les neurones GAD+ du CeC (D) et du CeL (E). Barre d'échelle, 50 µm.

CHAPITRE 2

Substrats neurobiologiques engagés dans le rappel d'évènements aversifs associés au sevrage des opiacés (« mémoire du sevrage »)

CHAPITRE 2

Substrats neurobiologiques engagés dans le rappel d'évènements aversifs associés au sevrage des opiacés (« mémoire du sevrage »)

I. PARTIE 1 : DISSOCIATIONS ANATOMIQUES ET FONCTIONNELLES DES EFFETS INCONDITIONNES ET CONDITIONNES DU SEVRAGE DES OPIACÉS

I.1. Introduction

Les comportements addictifs sont caractérisés par une perte de contrôle sur la consommation de drogue et par une vulnérabilité persistante à la rechute après abstinence suite à l'utilisation prolongée et répétée de la drogue (Robinson & Berridge, 2000). De multiples facteurs peuvent induire la rechute et réinitier un comportement de prise de drogue, comme la réintroduction de la drogue elle-même dans l'organisme, le stress, et les situations conditionnées (Koob & Le Moal, 2001). En effet, un désir intense pour la drogue (« *craving* ») est très souvent rapporté par les toxicomanes après réexposition à divers stimuli environnementaux qui étaient auparavant associés à la consommation de drogue (Childress *et al.*, 1993), et les stimuli conditionnés peuvent également réinitier un comportement de recherche compulsive de drogue chez l'animal (Stewart, 2000; Weiss *et al.*, 2001; Shalev *et al.*, 2002). Ainsi, des stimuli environnementaux à l'origine « neutres » peuvent acquérir des propriétés motivationnelles incitatives propres (« *incentive-motivation* ») par des processus d'apprentissage associatif suite à l'association répétée avec l'émergence d'états affectifs positifs et/ou négatifs associés à la consommation de drogues d'abus (Wikler, 1973; Stewart & Eikelboom, 1986; Siegel, 1999). Il a été proposé que de telles situations conditionnées pourraient réactiver les substrats neurobiologiques qui ont été précédemment modifiés par l'exposition répétée à la drogue elle-même, et ainsi réinitier des processus motivationnels poussant l'individu à consommer à nouveau la drogue (Stewart *et al.*, 1984; Self & Nestler, 1998; Koob & Le Moal, 2001).

Les corrélats neuroanatomiques et neurochimiques de la recherche de drogue initiée par les stimuli conditionnés ont été explorés jusqu'à présent en combinant des approches comportementales avec des études d'imagerie ou pharmacologiques, et dans la plupart des cas, en utilisant des stimuli associés aux effets appétitifs des drogues (pour revues : Everitt & Wolf, 2002; See, 2002). Par exemple, la réexposition à des stimuli associés à l'administration de drogues d'abus, que ce soit des psychostimulants ou des opiacés, est capable d'induire l'expression de la protéine c-Fos dans un certain nombre de structures limbiques (Brown *et al.*, 1992; Franklin & Druhan, 2000; Neisewander *et al.*, 2000; Schroeder *et al.*, 2000), et de provoquer une augmentation conditionnée de la libération de dopamine dans le noyau accumbens (Acb) (Fontana *et al.*, 1993; Di Ciano *et al.*, 1998; Ito *et al.*, 2000) et l'amygdale (Tran-Nguyen *et al.*, 1998; Weiss *et al.*, 2000). Récemment, des données pharmacologiques et neurochimiques ont également clarifié le rôle de la transmission glutamatergique dans l'Acb, qui pourrait être impliquée dans les effets conditionnés et les propriétés motivationnelles des stimuli environnementaux associés à la prise de drogue, et ainsi réinitier un comportement de consommation (Cornish & Kalivas, 2000; Hotsenpiller *et al.*, 2001). Cependant, très peu de données

sont disponibles à l'heure actuelle sur les processus neurobiologiques capables de médier les propriétés motivationnelles et incitatives (« *incentive* ») de l'état affectif négatif associé au sevrage des opiacés. En particulier, cette question n'a jamais été abordée en utilisant des situations environnementales associées avec le syndrome de sevrage des opiacés, malgré le fait que de plus en plus de travaux proposent que cet état de malaise aversif (et, par extension, les situations ou stimuli qui lui sont associés) pourrait, en fait, augmenter la valeur « *incentive* » de la drogue elle-même, et ainsi contribuer au maintien du comportement de recherche compulsive de drogue (Ahmed *et al.*, 2000; Hutcheson *et al.*, 2001; Harris & Aston-Jones, 2003).

Les résultats présentés dans le Chapitre 1 de ce manuscrit décrivent de manière extensive les territoires neuronaux impliqués dans le syndrome de sevrage des opiacés précipité par la naloxone, et montre qu'un circuit de structures limbiques pourrait jouer un rôle clé dans la modulation de la composante aversive du sevrage (composante motivationnelle), et que ce réseau peut être en partie dissocié des structures cérébrales qui sous-tendent la composante somatique du sevrage (Frenois *et al.*, 2002). Ainsi, pour aller plus loin dans la compréhension des propriétés motivationnelles et « *incentive* » du syndrome de sevrage et plus particulièrement de sa « mémoire » (rôle des stimuli conditionnés au sevrage), nous avons comparé les substrats neurobiologiques recrutés lors de la présentation de stimuli environnementaux précédemment associés au sevrage (effets conditionnés), avec ceux impliqués dans le syndrome de sevrage de la morphine précipité de manière aiguë par la naloxone (effets inconditionnés). Pour cela, nous avons analysé et quantifié l'expression de l'ARNm *c-fos* de manière extensive dans le cerveau en utilisant l'hybridation *in situ* quantitative, combinée à un modèle d'aversion de place conditionnée. Cette procédure expérimentale nous a également permis de tester l'influence relative de deux groupes de stimuli environnementaux sur l'expression conditionnée de l'ARNm *c-fos* (cf. § IV.2., Matériel & Méthodes)⁸.

I.2. Résultats⁹ : cartographie de l'expression de *c-fos*

I.2.1. Expression comportementale de l'aversion de place conditionnée induite par la naloxone

Les modifications du temps passé dans chaque compartiment du « *Y-maze* » pendant la phase de test comportemental par rapport à la phase de pré-conditionnement sont représentées sur la Figure 26. Pour les groupes contrôle (Ct) et ENV-, qui n'ont jamais expérimenté de syndrome de sevrage de la morphine dans la pièce du PAC, aucune aversion de place conditionnée n'est mesurée pour aucun des trois compartiments du « *Y-maze* » (« *Wilcoxon matched pairs test* » : n.s. pour tous les compartiments). En revanche, les animaux ENV+, qui ont été conditionnés avec une dose de 120 µg/kg de naloxone, expriment une intense aversion de place conditionnée pour leur compartiment associé à la naloxone (-289.9 ± 23.0 sec ; « *Wilcoxon matched pairs test* » : *P* = 0.0005). Lors du

⁸ Le protocole expérimental utilisé pour cette étude est rappelé sur la Figure 15.

⁹ Les figures et tableaux correspondant à cette partie sont insérés à la fin du Chapitre 2 dans la section intitulée « Figures et Tableaux du Chapitre 2 ».

conditionnement, un des compartiments du « Y-maze » a été associé à une injection de saline (compartiment cs-). Il est alors possible que ce compartiment soit associé par les animaux à l'effet appétitif de la morphine lors du conditionnement, et donc préféré le jour du test comportemental, or ce n'est pas le cas. En effet, les animaux ENV+ n'ont aucune stratégie particulière pour éviter le compartiment cs+, car ils divisent leur temps d'exploration de manière équitable entre le compartiment associé au saline et le compartiment neutre (« *Wilcoxon matched pairs test* » : $P = 0.0078$ pour le compartiment associé au saline, et $P = 0.0021$ pour le compartiment neutre).

Les résultats de l'aversion de place conditionnée indiquent que l'état affectif négatif généré par le syndrome de sevrage des opiacés a été transféré à des stimuli environnementaux par un phénomène d'apprentissage associatif (Mucha, 1987; Hand *et al.*, 1988; Stinus *et al.*, 1990). Par conséquent, dans la suite des expériences (réexposition aux stimuli conditionnés), les animaux ENV+ ont été séparés en deux groupes (ENV+/cs+ et ENV+/cs-), en prenant bien soin que globalement ces deux groupes montrent une aversion de place conditionnée équivalente (respectivement -299.3 ± 31.3 sec et -280.5 ± 35.7 sec).

1.2.2. Cartographie de l'expression de l'ARNm *c-fos* après réexposition à des stimuli associés au syndrome de sevrage ou après un sevrage précipité de manière aiguë par la naloxone

Les mesures quantitatives de l'expression de l'ARNm *c-fos* sont résumées dans le Tableau 3, et ont été réalisées dans 18 structures cérébrales (illustrées sur la Figure 16) qui ont été sélectionnées sur la base de notre étude précédente (cf. Chapitre 1), pour leur implication possible dans les composantes motivationnelle et/ou somatique du sevrage des opiacés (Frenois *et al.*, 2002). En accord avec cette dernière étude, un sevrage précipité par une dose de 120 µg/kg de naloxone chez des rats morphino-dépendants est également associé ici, avec des modifications de l'expression de *c-fos* dans toutes les structures analysées, excepté dans le PIC, pour lequel l'induction de l'ARNm *c-fos* n'atteint pas le seuil de significativité statistique. Par exemple, d'intenses inductions de *c-fos* sont détectées dans les structures de l'« *extended amygdala* » (AcbS, BNST et CeA), dans l'hippocampe et dans le septum latéral, mais également dans les noyaux dopaminergiques (VTA), noradrénergiques (LC et NTS) et hypothalamiques (PVH et LHA). Un grand nombre d'autres territoires cérébraux présentent également une induction de l'ARNm *c-fos* induite par la naloxone, incluant les aires corticales (CgC) et striatales (CPu et AcbC), et la substance grise périaqueducatale (PAG). Dans cette étude, le sevrage de la morphine a été précipité de manière aiguë par la naloxone dans un compartiment spécifique du « Y-maze » (au cours de la première session de conditionnement ; cf. § IV.2., Matériel & Méthodes). De manière intéressante, les modifications de l'expression de *c-fos* induites par la naloxone mesurées dans les différentes structures cérébrales analysées sont similaires à celles obtenues dans notre étude précédente (cf. Chapitre 1), dans laquelle le syndrome de sevrage aigu a également été précipité par 120 µg/kg de naloxone chez des rats morphino-dépendants, mais cette fois-ci dans leur cage d'élevage (Frenois *et al.*, 2002).

La réexposition des animaux conditionnés aux stimuli environnementaux préalablement associés au syndrome de sevrage des opiacés provoque des modifications significatives de l'expression de

l'ARNm *c-fos* dans un ensemble de structures cérébrales fortement interconnectées, qui inclut l'« *extended amygdala* », des régions impliquées dans les phénomènes d'apprentissage associatif (amygdale et hippocampe), et dans la VTA. De plus, d'intenses réponses *c-fos* conditionnées sont également détectées dans le locus coeruleus (LC) et le PVH. Dans l'ensemble de ces structures, l'analyse de variance (ANOVA) révèle un effet général chez les groupes d'animaux conditionnés (voir Tableau 3 pour la significativité). Le test *post hoc* « *Newman-Keuls multiple comparison test* » indique que les animaux ENV+ présentent des modifications significatives de l'expression de l'ARNm *c-fos* par rapport aux animaux des groupes Ct et ENV-, mais qu'il n'existe cependant aucune différence ni entre les groupes ENV+/cs+ et ENV+/cs-, ni entre les groupes Ct et ENV-. Ces résultats montrent que le pattern spécifique d'expression de *c-fos* détecté chez les animaux ENV+ (en comparaison avec les animaux du groupe ENV-) représente bien une réponse conditionnée, induite par l'exposition aux stimuli environnementaux associés au sevrage de la morphine, et non pas la simple conséquence pharmacologique des injections répétées de naloxone au cours du conditionnement. De plus, dans toutes les structures que nous avons analysées, des réponses *c-fos* conditionnées ont été détectées après réexposition des animaux à l'environnement de la pièce du PAC (ENV+), quelque soit le compartiment spécifique utilisé pour le confinement (cs+ ou cs-). L'ensemble de ces données souligne le fait que l'état affectif négatif généré par le sevrage des opiacés lors du conditionnement a été transféré non seulement au compartiment cs+ du « *Y-maze* » (comme le démontre les données du test comportemental), mais également au contexte environnemental général dans lequel a été effectué le conditionnement (comme le montrent les données anatomo-fonctionnelles de la cartographie de *c-fos*). Ainsi, il semble que l'ensemble des stimuli proximaux (caractéristiques des compartiments du « *Y-maze* ») et distaux (ensemble des caractéristiques de la pièce du PAC) aient été associés au syndrome de sevrage des opiacés, dans nos conditions expérimentales.

1.2.3. Comparaison entre les réponses *c-fos* conditionnées chez des rats réexposés aux stimuli associés au sevrage, et l'expression de *c-fos* induite par la naloxone chez des animaux morphino-dépendants

1.2.3.a. Structures de l'« *extended amygdala* » et structures impliquées dans les processus d'apprentissage associatif

L'AcbS, le BNST et le CeA sont fortement interconnectés et représentent les principaux composants de l'« *extended amygdala* » (Alheid & Heimer, 1988; Heimer *et al.*, 1997a; Heimer *et al.*, 1997b). Nous avons montré dans le Chapitre 1 de ce manuscrit que ce réseau limbique pourrait être impliqué de manière cruciale dans la modulation des propriétés aversives et motivationnelles du sevrage des opiacés précipité par la naloxone (Frenois *et al.*, 2002). Nous montrons ici que la densité de neurones *c-fos* positifs est très nettement augmentée dans l'AcbS après réexposition aux stimuli environnementaux associés au sevrage (respectivement +173 et +168% pour les groupes ENV+/cs+ et ENV+/cs-; $P < 0.001$ versus groupe ENV- pour les deux groupes; Figure 27B), et après un syndrome de sevrage aigu précipité par la naloxone (+434%; $P < 0.0001$ versus groupe Sal; Figure 27A).

Des inductions conditionnées de l'expression de l'ARNm *c-fos* sont également mesurées au niveau des parties ventrales et dorsales du BNST (respectivement +214 et +208% dans le BNSTv, +103 et +114% dans le BNSTd pour les groupes ENV+/cs+ et ENV+/cs- ; $P < 0.001$ versus groupe ENV- pour les deux groupes et dans les deux structures ; Figure 27D et Tableau 3), ainsi que d'intenses réponses *c-fos* inconditionnées induites par la naloxone (+506% dans le BNSTv, +435% dans le BNSTd ; $P < 0.0001$ versus groupe Sal dans les deux structures ; Figure 27D et Tableau 3). Aussi bien dans l'AcbS que dans le BNST, l'intensité de l'expression conditionnée de l'ARNm *c-fos* est toujours plus faible que l'effet de l'injection aiguë de naloxone (réponse inconditionnée).

La Figure 28A–D illustre des réponses conditionnées typiques mesurées dans l'Acb et le BNST. La partie médiale shell de l'Acb (lignes pointillé sur la Figure 28B), ainsi que les neurones situés dans la partie ventro-latérale présentent un intense marquage pour l'ARNm *c-fos*. En revanche, la partie core de l'Acb ne présente aucune variation de l'expression de l'ARNm *c-fos* chez les animaux conditionnés (Figure 28B) par rapport aux animaux du groupe ENV- (Figure 28A). Cette expression de *c-fos* différentielle au sein des sous-noyaux de l'Acb corrèle bien avec la dissociation fonctionnelle que nous avons décrite dans notre étude précédente (cf. Chapitre 1) entre les parties shell et core de l'Acb de rats morphino-dépendants, chez qui le sevrage aigu a été précipité par des doses faibles ou fortes de naloxone (Frenois *et al.*, 2002). L'ensemble de ces données supporte l'idée que, dans nos conditions expérimentales, l'AcbS serait spécifiquement impliqué dans les propriétés motivationnelles et « *incentive* » du sevrage des opiacés, au contraire de l'AcbC. Dans le BNST, le marquage *c-fos* est nettement plus intense dans la partie ventrale que dans la partie dorsale après exposition aux stimuli conditionnés (Figure 28D), ce qui est en accord avec le rôle crucial attribué au BNSTv dans la composante aversive motivationnelle du sevrage des opiacés (Delfs *et al.*, 2000).

L'amygdale est essentielle pour l'acquisition et l'expression de comportements motivés ayant une connotation affective importante (aussi bien appétitive qu'aversive) (Le Doux, 2000; Cardinal *et al.*, 2002; Everitt *et al.*, 2003), et le CeA et le BIA ont été impliqués de manière différentielle dans les processus d'apprentissage associatifs servant à attribuer une valeur affective particulière à des situations environnementales associées aux divers effets des drogues (Everitt *et al.*, 1999).

En accord avec ces données, nous montrons ici que des rats morphino-dépendants traités de façon répétée avec de la naloxone dans un environnement spécifique, présentent une induction conditionnée de l'expression de l'ARNm *c-fos* dans le BIA, suite à la réexposition des animaux à cet environnement (respectivement +75 et +65% pour les groupes ENV+/cs+ et ENV+/cs- ; $P < 0.01$ versus groupe ENV- pour les deux groupes ; Figure 27H), alors que l'expression de l'ARNm *c-fos* est diminuée dans le CeA (respectivement -41 et -38% pour les groupes ENV+/cs+ et ENV+/cs- ; $P < 0.05$ versus groupe Ct pour les deux groupes ; Figure 27F). De manière intéressante, des variations opposées de l'expression de l'ARNm *c-fos* ont été mesurées dans ces noyaux de l'amygdale après un sevrage de la morphine précipité par la naloxone (groupe Nal120). En effet, le CeA (et en particulier la partie capsulaire) présente une importante induction de l'expression de l'ARNm *c-fos* (+464% ; $P < 0.0001$ versus groupe Sal ; Figure 27E), alors que l'expression du gène *c-fos* est diminuée dans le BIA (-28% ; $P < 0.05$ versus groupe Sal ; Figure 27G), comme déjà montré dans le Chapitre 1 (Frenois *et al.*, 2002). L'ensemble de ces résultats démontre l'existence d'une double dissociation au niveau de

l'amygdale, en terme d'expression de l'ARNm *c-fos* entre le CeA et le BIA, qui est illustrée sur la Figure 29. Cette double dissociation suggère fortement que le CeA et le BIA pourraient médier de manière différentielle les effets aigus inconditionnés du syndrome de sevrage de la morphine et les propriétés motivationnelles des stimuli conditionnés au sevrage.

Dans l'hippocampe (Figure 30), la densité de neurones *c-fos* positifs est également augmentée après réexposition aux stimuli associés au sevrage de la morphine (respectivement +100 et +91% dans CA1, +83 et +64% dans CA3 pour les groupes ENV+/cs+ et ENV+/cs- ; $P < 0.05$ versus groupe ENV- pour les deux groupes dans CA1 ; $P < 0.001$ pour le groupe ENV+/cs+, et $P < 0.01$ pour le groupe ENV+/cs- versus groupe ENV- dans CA3 ; Figure 30B et D). L'intensité de l'expression conditionnée de l'ARNm *c-fos* est également plus faible que l'effet du sevrage aigu (Figure 30A et C). En effet, l'induction de l'ARNm *c-fos* atteint +344% dans CA1 et +246% dans CA3 après un sevrage précipité par 120 µg/kg de naloxone ($P < 0.0001$ versus groupe Sal dans les deux structures). Dans les deux situations, inconditionnée et conditionnée, la majorité du marquage dans l'hippocampe est localisée dans la couche des cellules pyramidale, alors que très peu de neurones marqués sont détectés dans les « *strata oriens* » et « *radiatum* ».

I.2.3.b. Aire tegmentale ventrale

Des variations de la transmission dopaminergique en provenance des neurones de la VTA dans les structures de l'« *extended amygdala* » sont supposées participer aux processus motivationnels liés à l'abus de drogue (Di Chiara *et al.*, 1999). Une diminution de l'activité des neurones dopaminergiques de la VTA a été décrite chez des rats en sevrage de la morphine (Diana *et al.*, 1995; Georges & Aston-Jones, 2003), ainsi qu'une réduction des niveaux extracellulaires de dopamine dans l'Acb (Pothos *et al.*, 1991; Acquas & Di Chiara, 1992; Rossetti *et al.*, 1992). En accord avec ces données, nous avons montré dans le Chapitre 1 que la majorité des interneurones GABAergiques de la VTA sont activés en terme d'expression de l'ARNm *c-fos* au cours du sevrage précipité par une dose de 120 µg/kg de naloxone, alors qu'une faible sous-population de neurones dopaminergiques est activée dans cette situation. Ces résultats suggèrent que l'activité de la majorité des neurones dopaminergiques de la VTA pourrait également être diminuée dans nos conditions expérimentales.

Le niveau basal d'expression de l'ARNm *c-fos* dans la VTA est très faible, que ce soit dans la situation conditionnée pour les groupes Ct et ENV- (respectivement 38 ± 5 et 30 ± 4 neurones par mm^2 ; Figure 31C et F), ou chez les animaux inconditionnés du groupe Sal (33 ± 4 neurones par mm^2 ; Figure 31A et E). La densité de neurones *c-fos* positifs est fortement augmentée dans la VTA après réexposition des animaux conditionnés aux stimuli associés au sevrage des opiacés (respectivement +253 et +273% pour les groupes ENV+/cs+ et ENV+/cs- ; $P < 0.001$ versus groupe ENV- pour les deux groupes ; Figure 31D et F), mais également après un sevrage aigu précipité par 120 µg/kg de naloxone (+261% ; $P < 0.0001$ versus groupe Sal ; Figure 31B et E). De manière intéressante, la VTA est la seule structure pour laquelle l'intensité de l'induction de l'ARNm *c-fos* mesurée chez les animaux conditionnés est similaire à l'effet inconditionné obtenu lors du sevrage précipité par la naloxone [respectivement 106 ± 8 et 112 ± 13 neurones par mm^2 chez les rats conditionnés des

groupes ENV+/cs+ et ENV+/cs-, en comparaison avec 119 ± 9 neurones par mm^2 après l'administration de $120 \mu\text{g/kg}$ de naloxone chez des rats morphino-dépendants (groupe Nal120)]. Ces résultats suggèrent que la VTA pourrait représenter un substrat critique sous-tendant les effets inconditionnés et conditionnés du sevrage des opiacés, et supportent fortement l'hypothèse selon laquelle les propriétés motivationnelles du sevrage pourraient être médiées par des modifications de l'activité des neurones de la VTA (Crippens & Robinson, 1994; Diana *et al.*, 1999).

I.2.3.c. Locus cœruleus et noyaux hypothalamiques

Une importante augmentation conditionnée de l'expression de l'ARNm *c-fos* est également détectée dans les neurones du LC (illustrée sur la Figure 28F et G) après réexposition des animaux aux stimuli environnementaux associés au sevrage. Cette structure noradrénergique présente la plus forte augmentation d'expression de *c-fos* en terme d'intensité, parmi toutes les structures que nous avons analysées, et ceci, que ce soit dans la situation conditionnée ou inconditionnée (voir le Tableau 3 pour une comparaison). En effet, les inductions conditionnées de l'expression de l'ARNm *c-fos* mesurées après réexposition aux stimuli associés au sevrage atteignent respectivement +635 et +683% pour les groupes ENV+/cs+ et ENV+/cs- ($P < 0.001$ versus groupe ENV- pour les deux groupes ; Figure 32B). Chez les rats en sevrage de la morphine aigu, le nombre de neurones exprimant l'ARNm *c-fos* par mm^2 atteint 718 ± 27 , par rapport à 55 ± 10 neurones par mm^2 chez les animaux contrôles (+1205% ; $P < 0.0001$ versus groupe Sal ; Figure 32A).

Le PVH présente également d'importantes augmentations de l'expression de l'ARNm *c-fos*, à la fois après réexposition des animaux aux stimuli associés au sevrage (respectivement +527 et +533% pour les groupes ENV+/cs+ et ENV+/cs- ; $P < 0.01$ versus groupe ENV- pour les deux groupes ; Figure 32D), et après un sevrage aigu précipité par la naloxone (+636% ; $P < 0.0001$ versus groupe Sal ; Figure 32C). En revanche, l'expression conditionnée et inconditionnée de l'ARNm *c-fos* est plus faible dans l'aire hypothalamique latérale (LHA ; Tableau 3). En effet, le nombre de neurones *c-fos* positifs par mm^2 dans la LHA atteint respectivement +67 et +74% pour les groupes ENV+/cs+ et ENV+/cs- ($P < 0.05$ versus groupe ENV- pour les deux groupes), et +197% chez les animaux en sevrage du groupe Nal120 ($P < 0.0001$ versus groupe Sal).

I.3. Discussion

Des observations cliniques ont montré depuis longtemps chez d'anciens toxicomanes abstinents que la simple exposition à des situations environnementales associées précédemment avec le sevrage des opiacés était capable d'induire des symptômes de sevrage conditionnés, et par conséquent, ces études ont suggéré que l'état aversif généré par de tels stimuli conditionnés pourrait à lui seul induire le « *craving* », motiver à nouveau le comportement de recherche de drogue et provoquer la rechute (Wikler, 1973; Jaffe, 1990). Au regard de ces données cliniques, notre étude décrit pour la première fois les substrats neurobiologiques qui sont recrutés lors du rappel d'évènements aversifs générés au cours de l'expérience passée du syndrome de sevrage de la morphine, et démontre également que

ces circuits neuronaux peuvent être partiellement dissociés des structures cérébrales qui sous-tendent le syndrome de sevrage aigu précipité par la naloxone.

1.3.1. Substrats neurobiologiques sous-tendant la « mémoire du sevrage »

Nos résultats montrent que la réexposition à un environnement précédemment associé de façon répétée au syndrome de sevrage des opiacés est capable de modifier l'expression conditionnée de l'ARNm *c-fos* dans un ensemble de structures limbiques fortement interconnectées (« *extended amygdala* », VTA, hippocampe, et BIA), ainsi que dans le locus cœruleus et les noyaux hypothalamiques. Toutes ces régions cérébrales ont été impliquées dans l'addiction aux substances opiacées et, en particulier, dans de nombreux processus mis en jeu au cours du syndrome de sevrage, comme l'« *incentive-learning* », les processus attentionnels et d'éveil comportemental, l'anxiété et le stress, ou encore le contrôle des réponses du système nerveux autonome (Koob *et al.*, 1992; Aston-Jones *et al.*, 1999b; Di Chiara, 1999; Koob, 1999; De Vries & Shippenberg, 2002; Everitt *et al.*, 2003).

De manière intéressante, le syndrome de sevrage de la morphine précipité par de très faibles doses de naloxone (< 20 µg/kg), qui par ailleurs sont capables d'induire une aversion de place conditionnée sans ou avec peu de signes somatiques, provoque également des modifications de l'expression de l'ARNm *c-fos* dans les structures de l'« *extended amygdala* » (AcbS, BNST et CeA), la VTA, l'hippocampe et dans le BIA (Gracy *et al.*, 2001; Frenois *et al.*, 2002), ce qui suggère fortement que l'ensemble de ces structures limbiques pourrait médier de façon spécifique les propriétés motivationnelles des stimuli conditionnés au sevrage (cf. Chapitre 1).

Le locus cœruleus présente une intense induction conditionnée de l'ARNm *c-fos*, ce qui suggère que ce noyau pourrait également être impliqué dans le rappel et/ou dans l'expression d'évènements aversifs induits par la réexposition aux stimuli environnementaux associés au sevrage au cours du conditionnement. Ceci contraste fortement l'idée commune qui, en général, exclut la participation du LC dans la composante aversive du sevrage (Caillé *et al.*, 1999; Delfs *et al.*, 2000; Frenois *et al.*, 2002), et qui, au contraire, associe l'activation de cette structure au cours du sevrage de la morphine à l'expression des symptômes somatiques (Aghajanian, 1978; Rasmussen *et al.*, 1990; Maldonado, 1997). Ces résultats apparemment contradictoires sont difficiles à interpréter dans la mesure où l'on considère classiquement le locus cœruleus comme une structure impliquée dans la composante somatique du sevrage. Cependant, le LC ainsi que d'autres régions comme par exemple certains noyaux hypothalamiques (dans lesquels nous montrons également une induction conditionnée de *c-fos*) sont des substrats neuronaux essentiels à l'expression de la réponse au stress et à l'anxiété, ainsi qu'aux processus attentionnels et à l'éveil comportemental (Aston-Jones *et al.*, 1999b; Koob, 1999). Ces phénomènes sont probablement mis en jeu d'une manière ou d'une autre dans nos deux situations expérimentales (inconditionnée et conditionnée) et pourraient participer à l'induction de *c-fos* que nous détectons dans ces structures.

Les structures de l'« *extended amygdala* » sont sous le contrôle modulateur de projections dopaminergiques ascendantes en provenance de la VTA (Phelix *et al.*, 1992; Freedman & Cassell,

1994). Elles intègrent également de nombreuses informations en provenance de régions du télencéphale (cortex entorhinal et limbique, hippocampe et BIA), et en retour projettent sur différents sites effecteurs, tels que l'hypothalamus, le LC et les noyaux autonomes du tronc cérébral (Alheid & Heimer, 1988; Schmued, 1994; Cardinal *et al.*, 2002). Cette organisation fournit un support anatomique pour le traitement et l'intégration d'évènements à forte connotation émotionnelle, en relation avec un ensemble de stimuli environnementaux, dans le but d'organiser un comportement motivé et adapté (Cardinal *et al.*, 2002; Everitt *et al.*, 2003).

Par conséquent, nous proposons que le pattern d'expression de l'ARNm *c-fos* que nous détectons dans ces structures après un syndrome de sevrage de la morphine précipité par la naloxone dans un environnement spécifique (un des compartiments du « *Y-maze* ») pourrait refléter ① au-delà de l'effet purement inconditionné dû à l'injection aiguë de la naloxone, la mise en place de processus d'apprentissage associatif permettant d'encoder la valeur affective « *incentive* » des stimuli environnementaux associés au sevrage des opiacés, dans la situation inconditionnée (« *incentive-learning* »), et ② le rappel et l'expression des associations apprises au cours du conditionnement, dans la situation conditionnée.

1.3.2. Rôle des stimuli proximaux et distaux associés au sevrage des opiacés

Pendant la phase de test comportemental qui a lieu 24 heures après la troisième et dernière session de conditionnement (J11), et dans laquelle les animaux peuvent explorer librement le « *Y-maze* », tous les rats ENV+ (ENV+/cs+ et ENV+/cs-) évitent le compartiment qui a été associé à l'injection de naloxone lors du conditionnement (compartiment cs+), et divisent leur temps d'exploration entre le compartiment associé au saline (compartiment cs-) et le compartiment neutre. Ce résultat montre que les animaux conditionnés sont capables d'évaluer les différentes caractéristiques des compartiments du « *Y-maze* » pour élaborer leur choix et ainsi éviter le compartiment aversif.

Afin de tester l'effet des stimuli environnementaux associés au sevrage sur l'induction de *c-fos*, les animaux conditionnés sont réexposés dans des compartiments spécifiques du « *Y-maze* », 72 heures après la troisième et dernière session de conditionnement (J13). Lorsque les animaux ENV+ sont confinés soit dans le compartiment cs+ (ENV+/cs+) soit dans le compartiment cs- (ENV+/cs-), dans le contexte de la pièce du PAC, deux résultats majeurs apparaissent : ① la cartographie de l'ARNm *c-fos* démontre qu'un circuit neuronal spécifique est recruté après réexposition au contexte (ENV+) dans lequel le sevrage des opiacés a été précédemment précipité, par rapport aux animaux ENV- qui ont expérimenté le sevrage dans un autre environnement (cage d'élevage), et ② bien que les rats conditionnés évitent le compartiment spécifique dans lequel ils ont reçu la naloxone (cs+) lorsqu'on leur donne le choix le jour du test comportemental, un pattern similaire d'expression de l'ARNm *c-fos* est obtenu après réexposition aux compartiments cs+ ou cs-, ce qui suggère l'existence d'un effet de généralisation au contexte dans cette situation particulière.

L'ensemble de ces données indique que les animaux sont capables d'associer les groupes de stimuli proximaux (caractéristiques d'un compartiment donné du « *Y-maze* »), ainsi que l'ensemble des stimuli distaux (caractéristiques de la pièce du PAC dans laquelle ont été effectuées les sessions

de conditionnement) avec le sevrage des opiacés. Ces deux ensembles de stimuli sont capables par la suite d'influencer la réactivité du cerveau et le comportement de l'animal, en fonction de la situation expérimentale. En effet, lorsqu'ils sont confinés dans un compartiment spécifique du « *Y-maze* », les animaux doivent utiliser plus facilement les stimuli distaux du contexte de la pièce du PAC (probablement parce qu'ils ne sont plus capables de discriminer par comparaison entre les différentes caractéristiques de chacun des compartiments), alors que lorsqu'ils ont le choix, les animaux utilisent les stimuli proximaux pour diriger leur activité dans le « *Y-maze* ».

1.3.3. Les substrats neuronaux impliqués dans le rappel d'évènements aversifs associés au sevrage sont partiellement dissociés de ceux recrutés par le sevrage aigu

Les patterns d'expression de l'ARNm *c-fos* que nous détectons après la réexposition des animaux conditionnés aux stimuli environnementaux associés au sevrage de la morphine et après un sevrage aigu précipité par la naloxone, ne sont pas complètement identiques dans le cerveau, et peuvent même être en partie dissociés. En effet, les stimuli associés au sevrage des opiacés modifient l'expression conditionnée de l'ARNm *c-fos* dans l'« *extended amygdala* », la VTA, l'hippocampe, le BIA, le LC et l'hypothalamus, qui ne représentent qu'une partie du grand nombre de structures cérébrales recrutées par le syndrome de sevrage aigu précipité par la naloxone.

De plus, nous montrons l'existence d'une double dissociation en terme d'expression de l'ARNm *c-fos* au niveau de l'amygdale. En effet, alors que l'expression de *c-fos* induite par la naloxone est augmentée dans le CeA, elle est diminuée dans le BIA (ce qui est en outre en accord avec les résultats décrits dans la Chapitre 1). Au contraire, lors de la réexposition des animaux aux stimuli conditionnés au sevrage, nous détectons des réponses opposées dans ces deux noyaux, à savoir que l'expression conditionnée de *c-fos* est cette fois-ci augmentée dans le BIA, alors qu'elle est diminuée dans le CeA. Ces données suggèrent que les mécanismes neurobiologiques et psychobiologiques qui sous-tendent les effets inconditionnés et conditionnés du sevrage pourraient être en partie différents entre les noyaux central et basolatéral de l'amygdale. Quoi qu'il en soit, ces résultats démontrent l'existence de dissociations anatomiques et fonctionnelles dans les mécanismes neurobiologiques qui sous-tendent les propriétés motivationnelles et « *incentive* » des stimuli associés au sevrage et du syndrome de sevrage aigu.

De manière intéressante, nos données corréleront bien avec de nombreuses études, réalisées pour la plupart dans des modèles animaux de recherche compulsive de drogue et/ou de rechute¹⁰, et qui se sont focalisées sur la comparaison des propriétés appétitives inconditionnées et conditionnées des psychostimulants, et dans une moindre mesure des opiacés (Self & Nestler, 1998; See, 2002; Shalev *et al.*, 2002). En effet, l'analyse de l'expression de la protéine c-Fos dans le cerveau, ainsi que l'utilisation de procédures d'inactivation de structures cérébrales de façon locale et transitoire ont également souligné l'existence de dissociations partielles entre les substrats neuronaux qui sous-

¹⁰ Ces modèles expérimentaux analysent la réinstallation d'un comportement d'autoadministration intraveineuse de drogue (après extinction de ce comportement) induite par la seule présentation d'un stimulus (lumière, son, etc...) présent lors de la consommation de la drogue.

tendent les effets des stimuli associés à la prise de drogue et les structures cérébrales mises en jeu dans les processus de renforcement (Brown *et al.*, 1992), ou dans le comportement de réinstallation de la consommation induit par la drogue elle-même (effet « *priming* ») (Grimm & See, 2000; Neisewander *et al.*, 2000). Ces données sont en contradiction avec l'hypothèse avançant que les stimuli associés aux effets des drogues pourraient à nouveau initier un comportement de recherche compulsive de drogue en réactivant des processus neurobiologiques similaires à ceux qui sont engagés par la drogue elle-même (Stewart *et al.*, 1984).

D'une manière générale, il est à présent admis que les propriétés « *incentive* » et motivationnelles d'une injection « *priming* » de drogue après extinction, sur la réinstallation du comportement de recherche de drogue, impliquent le système mésolimbique, et en particulier des mécanismes dopaminergiques dans le noyau accumbens passant par l'activation des récepteurs de type D₂ (pour revues : Stewart *et al.*, 1984; Shalev *et al.*, 2002). En revanche, le noyau basolatéral de l'amygdale et non pas l'Acb apparaît en fait comme la structure cérébrale la plus critique qui permet de médier le phénomène de réinstallation du comportement de prise de drogue induit par des stimuli conditionnés (Meil & See, 1997; Grimm & See, 2000), et cet effet semble au contraire dépendre de mécanismes impliquant l'action de la dopamine sur des récepteurs dopaminergiques de type D₁ dans l'amygdale (Weiss *et al.*, 2000; Ciccocioppo *et al.*, 2001; See *et al.*, 2001). Par conséquent, bien que des processus impliquant la dopamine pourraient être engagés dans l'initiation de la recherche compulsive de drogue induite aussi bien par des injections « *priming* » de drogue, que par la présentation de stimuli associés précédemment à la consommation de la drogue, l'ensemble de ces données montre qu'il existe des dissociations neuroanatomiques (BIA/Acb) et pharmacologiques (récepteurs de type D₁/récepteurs de type D₂) qui sous-tendent ces phénomènes différents.

L'action de la dopamine dans l'amygdale et/ou dans le noyau accumbens apparaît comme un phénomène impliqué de manière critique dans les processus addictifs, et plus particulièrement, des modifications de l'activité du système mésolimbique pourraient en partie sous-tendre les propriétés motivationnelles et « *incentive* » des drogues d'abus et des stimuli qui sont associés à leurs effets. Il a en effet été montré que la présentation de stimuli environnementaux associés à la consommation de cocaïne est capable de provoquer des augmentations conditionnées de la libération de dopamine dans l'amygdale et l'Acb (Weiss *et al.*, 2000), et que le blocage des récepteurs de type D₁ par le SCH.23390 reverse l'induction conditionnée de l'expression de la protéine c-Fos dans le BIA, mais également la réinstallation du comportement de prise de drogue induite par des stimuli conditionnés (Ciccocioppo *et al.*, 2001).

De manière intéressante, le rappel d'associations Pavloviennes possédant une forte connotation aversive est également modulé par l'activité de projections mésolimbiques dirigées vers l'amygdale, et implique également l'action de la dopamine sur des récepteurs de type D₁ (Nader & Le Doux, 1999). En accord avec ces données, nous montrons ici que la simple présentation de stimuli environnementaux associés au sevrage des opiacés induit l'expression de l'ARNm *c-fos* dans la VTA, ainsi que dans ses territoires de projections (Acb et BIA). Cependant, si les processus de rappel d'évènements aussi bien appétitifs qu'avertifs peuvent partager certaines caractéristiques au niveau du circuit VTA/amygdale, il existe néanmoins des dissociations dans le contrôle de l'activité du

système VTA/Acb par des stimuli possédant une forte connotation affective (Louilot & Besson, 2000). En effet, l'inhibition de l'activité du système mésolimbique dopaminergique au niveau de l'Acb a été impliquée dans les phénomènes d'aversion conditionnée (Mark *et al.*, 1991; Schechter & Meechan, 1994). Par conséquent, l'activation des récepteurs de type D₁ dans l'amygdale et en particulier dans le BIA pourrait moduler les processus permettant la récupération d'associations appétitives ou aversives mises en mémoire, alors que l'altération de la transmission dopaminergique au niveau de l'Acb pourrait rendre compte de la valeur « *incentive* » des stimuli conditionnés (Besson & Louilot, 1995; Nader & Le Doux, 1999; Louilot & Besson, 2000).

Ainsi, nous proposons que, dans notre situation expérimentale, le rappel d'associations aversives est traité par l'intermédiaire de mécanismes mettant en jeu l'action de la dopamine dans l'amygdale, aboutissant à une augmentation de l'activité des neurones du BIA, qui pourraient au final diriger le comportement de recherche de drogue au travers de modifications du contrôle dopaminergique de l'Acb. Pour avancer dans la compréhension de ces processus, nous avons analysé de façon détaillée l'expression de l'ARNm *c-fos* dans des neurones phénotypiquement identifiés de la VTA et de l'amygdale. Les résultats sont présentés dans la Partie 2 de ce Chapitre (cf. § II., ci-dessous).

I.4. Conclusions

Nos résultats montrent l'existence d'un circuit neuronal spécifique capable de sous-tendre le rappel d'événements aversifs associés au sevrage des opiacés, et qui de surcroît peut être partiellement dissocié des substrats neurobiologiques impliqués dans le syndrome de sevrage aigu. Les différents patterns d'expression de l'ARNm *c-fos* que nous détectons pourraient refléter en partie ① les processus neurobiologiques mis en jeu lors de l'encodage de la valeur « *incentive* » des stimuli environnementaux associés au sevrage, dans la situation inconditionnée, et ② la récupération et l'expression des associations aversives mises en mémoire, dans la situation conditionnée.

Nos données supportent les études cliniques réalisées chez des toxicomanes abstinents, qui souvent rapportent l'émergence d'un sentiment de « *craving* » associé à l'apparition de certains symptômes caractéristiques du sevrage comme par exemple la dysphorie, lorsqu'ils sont confrontés à des situations leur rappelant les conditions dans lesquelles ils ont expérimenté l'effet de la drogue ou de son sevrage (Wikler, 1973; Jaffe, 1990). De manière intéressante, la rechute peut survenir après une très longue période d'abstinence chez les toxicomanes, et chez l'animal, une aversion de place conditionnée peut être mise en évidence jusqu'à plus d'un an chez le rat post-dépendant à la morphine (Stinus *et al.*, 2000; L. Stinus & S. Caillé, données non publiées). Ces observations mettent en évidence que la « mémoire du sevrage » pourrait également contribuer à l'induction du « *craving* » et à la rechute même après une longue période d'abstinence (Siegel, 1999; Grimm *et al.*, 2001).

Si la capacité des stimuli associés au sevrage des opiacés à motiver un comportement de recherche de drogue chez le rat abstinent n'a pas encore été évaluée de manière directe dans les modèles d'autoadministration intraveineuse de drogue, il a été proposé que les stimuli associés au sevrage pourraient augmenter la valeur « *incentive* » de la morphine (ou de l'héroïne) elle-même (ou « *wanting* », cf. § III.2., Introduction Générale), dans le but de maintenir à plus ou moins long terme le

comportement compulsif de recherche et de consommation de drogue (Ahmed *et al.*, 2000; Hutcheson *et al.*, 2001; Harris & Aston-Jones, 2003). Nos résultats sont par conséquent d'un intérêt certain pour une meilleure compréhension de ces processus conditionnés, et supportent solidement l'hypothèse selon laquelle le sevrage aurait un rôle motivationnel et incitatif important (« *incentive-motivation* ») dans les événements psychobiologiques conduisant à l'addiction aux substances opiacées (Bechara *et al.*, 1998).

☺☺☺

Le travail présenté dans cette partie a donné lieu à l'écriture d'un article récemment soumis à Journal of Neurosciences : Frenois F., Stinus L., Le Moine C., Cador M. (2003) Neural circuits underlying opiate withdrawal memories. I. C-fos imaging dissociates between acute withdrawal experience and re-exposure to a withdrawal-paired environment. J Neurosci Soumis : #JN-RM-3193-03.

☺☺☺

II. PARTIE 2 : IMPLICATION DIFFERENTIELLE DE DIVERSES SOUS-POPULATIONS NEURONALES DANS L'AIRE TEGMENTALE VENTRALE ET L'AMYGDALE

II.1. Introduction

Il est reconnu que le système dopaminergique mésolimbique est impliqué de manière cruciale dans le développement des comportements addictifs (pour revues : Wise, 1996b; Di Chiara *et al.*, 1999; Koob & Le Moal, 2001). La morphine, ainsi que d'autres agonistes des récepteurs opioïdes de type μ comme par exemple l'héroïne, provoque une inhibition des interneurons GABAergiques de l'aire tegmentale ventrale (VTA), qui pour leur part, inhibent de manière tonique les neurones efférents dopaminergiques. Par conséquent, les opiacés provoquent de manière indirecte une activation des neurones dopaminergiques, ainsi qu'une augmentation de la libération de dopamine dans les territoires de projections limbiques (pour revue : Di Chiara & North, 1992). En revanche, le sevrage de la morphine diminue l'activité électrique des neurones dopaminergiques mésolimbiques (Diana *et al.*, 1995; Georges & Aston-Jones, 2003), et cet effet semble médié par la désinhibition des interneurons GABAergiques de la VTA (Bonci & Williams, 1997; Shaw-Lutchman *et al.*, 2002).

En accord avec ces résultats, nous avons montré dans le Chapitre 1 que la majorité des interneurons GABAergiques de la VTA sont activés en terme d'expression de l'ARNm *c-fos* au cours du sevrage précipité par la naloxone. De plus, les résultats décrits dans la Partie 1 de ce Chapitre montrent que la VTA présente des inductions de l'ARNm *c-fos* qui sont d'intensités relativement similaires, que ce soit après un syndrome de sevrage précipité de manière aiguë par la naloxone (situation inconditionnée), ou après réexposition des animaux à des stimuli précédemment associés

au sevrage de la morphine (situation conditionnée). L'ensemble de ces données suggère que des variations spécifiques de l'activité du système dopaminergique mésolimbique pourraient sous-tendre les propriétés motivationnelles et « *incentive* » du sevrage des opiacés (Crippens & Robinson, 1994; Diana *et al.*, 1999), mais également la mise en place de processus d'apprentissage motivationnels (« *incentive-learning* »), supposés impliqués dans le maintien de la consommation de drogue (Ahmed & Koob, 1998; Hutcheson *et al.*, 2001; Harris & Aston-Jones, 2003). Cependant, les mécanismes par lesquels la dopamine pourrait réguler ces processus dans les structures du système mésolimbique sont encore inconnus.

Une partie des neurones dopaminergiques de la VTA innerve chacun des noyaux de l'amygdale (Freedman & Cassell, 1994; Brinley-Reed & McDonald, 1999), ce qui suggère que la dopamine pourrait moduler de manière très précise l'activité des neurones de l'amygdale. En effet, des mécanismes cellulaires médiés par la dopamine dans l'amygdale ont été impliqués dans les phénomènes d'apprentissage associatif (pour revue : Grace & Rosenkranz, 2002), ainsi que dans l'effet des stimuli conditionnés sur la réinstallation du comportement de recherche de drogue dans des modèles d'autoadministration intraveineuse (pour revue : Shalev *et al.*, 2002).

Le noyau basolatéral de l'amygdale (BIA) est une structure dont l'organisation ressemble à celle du cortex, dans laquelle des interneurons inhibiteurs GABAergiques contrôlent l'activité de neurones pyramidaux efférents de type glutamatergique (Pitkanen *et al.*, 1997). Les neurones efférents excitateurs du BIA innervent à leur tour les neurones GABAergiques du noyau central de l'amygdale (CeA), notamment via un cluster d'interneurones inhibiteurs (ITC) (Millhouse, 1986; Nitecka & Ben-Ari, 1987; Cassell *et al.*, 1999). Cette architecture intrinsèque, ainsi que les connexions afférentes et efférentes du CeA et du BIA, peuvent sous-tendre la façon dont les informations sensorielles sont traitées au sein de l'amygdale pendant un apprentissage de type Pavlovien. En effet, la dopamine pourrait servir à moduler les processus permettant de lier une valeur émotionnelle particulière aux stimuli sensoriels afférents au BIA (Rosenkranz & Grace, 2002b), mais elle pourrait également jouer un rôle important dans le filtrage des informations sensorielles, afin de déterminer quel type de stimuli pourrait accéder aux structures de sortie du BIA, qui incluent le CeA (Royer *et al.*, 1999; Pare *et al.*, 2003) et le noyau accumbens (Louilot *et al.*, 1985; Cador *et al.*, 1991a; Louilot & Besson, 2000).

De manière intéressante, les résultats décrits dans la Partie 1 de ce Chapitre, concernant les variations conditionnées et inconditionnées de l'expression de *c-fos* dans les différents noyaux de l'amygdale, montrent une double dissociation entre le BIA et le CeA, ce qui suggère que les processus neurobiologiques qui sous-tendent les propriétés motivationnelles du syndrome de sevrage des opiacés et des stimuli environnementaux associés au sevrage pourraient être en partie différents dans ces noyaux. En accord avec ces données, le BIA et le CeA ont été impliqués de manière différentielle dans l'acquisition et l'expression de comportements motivés ayant une forte valeur émotionnelle (pour revues : Le Doux, 2000; Cardinal *et al.*, 2002).

Dans ce contexte, et afin de mieux comprendre les mécanismes cellulaires qui sous-tendent la formation et le rappel de la « mémoire du sevrage des opiacés », nous avons analysé de manière détaillée les patterns d'expression de l'ARNm *c-fos* dans la VTA et les différents noyaux constituant

l'amygdale. Pour cela, nous avons analysé et quantifié l'expression de l'ARNm *c-fos* dans des neurones phénotypiquement identifiés de la VTA, du BIA et du CeA, en utilisant l'hybridation *in situ* en double marquage sur le même matériel.

Il est important de garder à l'esprit que, chez les rats dits « inconditionnés », le syndrome de sevrage de la morphine précipité par la naloxone a été expérimenté dans un compartiment spécifique du « *Y-maze* » (au cours de la première session de conditionnement). Par conséquent, les réponses *c-fos* détectées chez ces animaux pourraient en partie refléter la formation d'associations Pavloviennes entre l'état aversif provoqué par le sevrage et des stimuli environnementaux présents lors du conditionnement (en particulier dans l'amygdale qui est une région fortement impliquée dans les phénomènes d'apprentissage associatif). En revanche, les réponses *c-fos* conditionnées, obtenues lors de la réexposition des animaux aux stimuli précédemment associés au sevrage, reflètent plutôt le rappel des associations mises en mémoire lors du conditionnement.

II.2. Résultats¹¹ : caractérisation phénotypique des neurones recrutés

Aussi bien dans la VTA que dans les noyaux de l'amygdale (CeA et BIA), les patterns inconditionnés et conditionnés de l'expression globale de *c-fos* que nous détectons ici (voir Tableau 4) confirment les résultats obtenus précédemment lors d'expériences d'hybridation *in situ* en simple marquage pour l'ARNm *c-fos* (cf. § I., ci-dessus). De même, nous montrons à nouveau ici qu'il n'y a pas de différence d'expression de *c-fos* entre les animaux des groupes ENV+/cs+ et ENV+/cs-, ni dans la VTA, ni dans les différents noyaux de l'amygdale, alors que ces deux groupes sont significativement différents des animaux du groupe ENV-. Ces données semblent indiquer que les rats conditionnés utilisent de préférence le groupe de stimuli distaux pour la récupération des associations entre sevrage et stimuli environnementaux mémorisées, comme discuté précédemment (cf. § I.3.2., ci-dessus).

II.2.1. Les réponses *c-fos* inconditionnées et conditionnées dans la VTA concernent principalement les neurones GABAergiques et une faible sous-population de neurones dopaminergiques

Afin d'analyser dans quel type de neurones de la VTA (dopaminergiques ou GABAergiques) l'expression de l'ARNm *c-fos* est induit, nous avons réalisé des expériences de double marquage avec une sonde radioactive pour l'ARNm *c-fos* et avec une sonde marquée à la digoxygénine dirigée contre l'ARNm TH. Ainsi, les neurones marqués TH positifs (TH+) correspondent à la population dopaminergique, alors que les neurones TH négatifs (TH-) sont considérés comme appartenant à la population GABAergique. Le sevrage de la morphine précipité par la naloxone (groupe Nal120 ; Figure 33A) provoque une augmentation du nombre de neurones *c-fos*+/TH+ et *c-fos*+/TH- par mm² qui atteint respectivement +325 et +544% après une dose de 120 µg/kg de naloxone ($P < 0.01$ pour les neurones *c-fos*+/TH+, $P < 0.0001$ pour les neurones *c-fos*+/TH- versus groupe Sal). La réexposition des rats conditionnés aux stimuli environnementaux associés précédemment au sevrage

¹¹ Les figures et tableaux correspondant à cette partie sont insérés à la fin du Chapitre 2 dans la section intitulée « Figures et Tableaux du Chapitre 2 ».

de la morphine (groupes ENV+/cs+ et ENV+/cs- ; Figure 33B) provoque également une induction de l'expression conditionnée de l'ARNm *c-fos* aussi bien dans les neurones TH+ (respectivement +309 et +315% pour les groupes ENV+/cs+ et ENV+/cs- ; $P < 0.01$ versus groupe ENV- pour les deux groupes) que dans les neurones TH- (respectivement +265 et +296% pour les groupes ENV+/cs+ et ENV+/cs- ; $P < 0.01$ versus groupe ENV- pour les deux groupes).

La réponse globale *c-fos* est répartie de façon équitable dans les deux populations neuronales (environ 50% de neurones *c-fos*+/TH+ et 50% de neurones *c-fos*+/TH-), et ceci, dans nos deux situations expérimentales, quel que soit le groupe de rats considéré. Cependant, la grande majorité des neurones TH positifs ne semble pas affectée ni par le sevrage aigu, ni par la réexposition aux stimuli conditionnés (voir Figure 34). En effet, seule une faible proportion des neurones TH+ présente une induction de l'ARNm *c-fos* aussi bien dans la situation inconditionnée ($13 \pm 2\%$ pour le groupe Nal120 ; Figure 33C), que conditionnée ($14 \pm 2\%$ pour le groupe ENV+/cs+ et $13 \pm 2\%$ pour le groupe ENV+/cs- ; Figure 33D). En revanche, l'ARNm *c-fos* est induit dans la majorité des neurones GABAergiques après un sevrage aigu ($80 \pm 8\%$ pour le groupe Nal120 ; Figure 33E), mais également après réexposition aux stimuli associés au sevrage (respectivement $65 \pm 9\%$ et $67 \pm 8\%$ pour les groupes ENV+/cs+ et ENV+/cs- ; Figure 33F).

II.2.2. Réponses opposées dans le BIA et le CeA après un sevrage aigu et après réexposition aux stimuli associés au sevrage

II.2.2.a. Une majorité de neurones GAD négatifs est inhibée au cours du sevrage aigu, mais activée après réexposition aux stimuli associés au sevrage

Nous avons réalisé des expériences de double marquage avec une sonde radioactive pour l'ARNm *c-fos* et une sonde marquée à la digoxygénine dirigée contre l'ARNm GAD/67, afin de déterminer dans quelle population neuronale du BIA (GABAergique ou glutamatergique) s'effectuent les réponses *c-fos* opposées entre nos deux situations, inconditionnée et conditionnée.

Le sevrage des opiacés précipité par la naloxone diminue le nombre de neurones *c-fos* positifs par mm² dans le BIA, et le double marquage montre que cette diminution affecte principalement les neurones GAD négatifs (Figure 35A et Figure 36A et B). En effet, la densité de neurones *c-fos*+/GAD- par mm² diminue fortement pour atteindre -67% après l'administration de 120 µg/kg de naloxone (groupe Nal120 ; histogrammes gris clairs, Figure 35A ; $P < 0.001$ versus groupe Sal), alors que le nombre de neurones GAD+ exprimant l'ARNm *c-fos* n'est pas modifié de manière significative dans la situation inconditionnée (groupe Nal120 ; histogrammes gris foncés, Figure 35A ; t-test non apparié : n.s. versus groupe Sal).

En revanche, la réexposition des animaux conditionnés aux stimuli environnementaux associés au sevrage augmente la densité de neurones *c-fos* positifs dans le BIA, et cette augmentation affecte également la population GAD négative (Figure 35B et Figure 36C et D). En effet, le nombre de neurones *c-fos*+/GAD- par mm² augmente chez les animaux ENV+ (respectivement +95 et +67% pour les groupes ENV+/cs+ et ENV+/cs- ; $P < 0.001$ pour le groupe ENV+/cs+, et $P < 0.01$ pour le groupe ENV+/cs- versus groupe ENV- ; histogrammes gris clairs, Figure 35B), alors que la densité de neurones *c-fos*+/GAD+ n'est pas modifiée de façon drastique dans la situation conditionnée (ANOVA :

$P = 0.0477$; « Newman-Keuls multiple comparison test » : n.s. pour tous les groupes conditionnés ; histogrammes gris foncés, Figure 35B).

II.2.2.b. Les réponses inconditionnées et conditionnées sont opposées dans les neurones GABAergiques du CeA

Dans le CeA (composé en majorité de neurones GABAergiques), les réponses *c-fos* inconditionnées et conditionnées sont détectées dans des neurones GAD+ (voir Figure 36E–H). Néanmoins, dans le CeA, les patterns de variations de l'expression de *c-fos* sont opposés aux modifications détectées dans le BIA, aussi bien après un sevrage aigu précipité par la naloxone (Figure 35C et Figure 36E et F), qu'après réexposition aux stimuli associés au sevrage (Figure 35D et Figure 36G et H). En effet, le nombre de neurones *c-fos*+/GAD+ par mm² est augmenté de façon intense dans le CeA après 120 µg/kg de naloxone (groupe Nal120 ; Figure 35C et Figure 36F) qui atteint +1229% ($P < 0.0001$ versus groupe Sal). Au contraire, pour les animaux des groupes ENV+/cs+ et ENV+/cs-, la réexposition aux stimuli conditionnés (Figure 35D et Figure 36H) diminue de manière significative la densité de neurones *c-fos*+/GAD+ par mm² par rapport aux rats du groupe ENV- (respectivement -25 et -24% pour les groupes ENV+/cs+ et ENV+/cs- ; $P < 0.05$ versus groupe Ct).

II.2.3. Une sous-population de neurones GAD négatifs du BIA est activée chez les rats en sevrage de la morphine

La Figure 36A–D illustre les variations de l'expression de l'ARNm *c-fos* opposées entre les situations inconditionnée et conditionnée, mesurées dans des neurones phénotypiquement identifiés du BIA. Dans la situation inconditionnée contrôle (Figure 36A), un grand nombre de neurones GAD négatifs exprime l'ARNm *c-fos*, alors que très peu de neurones GAD+ présentent un marquage *c-fos*. Le niveau basal d'expression de l'ARNm *c-fos* par neurone (densité de grains d'argent) est relativement faible aussi bien dans les neurones GAD+ que dans les neurones GAD- (Figure 36A). La densité de neurones *c-fos* positif est beaucoup plus faible chez les animaux ENV- (en comparaison avec la situation inconditionnée contrôle), et seulement quelques neurones GAD- clairsemés montrent un marquage *c-fos* détectable (Figure 36C). Après un syndrome de sevrage précipité par 120 µg/kg de naloxone (Figure 36B), la densité de neurones *c-fos*+/GAD- par mm² est clairement diminuée, mais de manière intéressante, les neurones marqués restant présentent une très forte densité de grains d'argent (têtes de flèches grises dans la Figure 36B) en comparaison avec la situation contrôle (têtes de flèches grises dans la Figure 36A). En revanche, la réexposition des animaux conditionnés aux stimuli environnementaux associés au sevrage induit une augmentation de la densité des neurones *c-fos*+/GAD- (Figure 36D), qui s'accompagne d'une augmentation du nombre de grains d'argent par neurone, par rapport aux animaux ENV- (Figure 36C).

Dans le BIA, le sevrage précipité par la naloxone provoque une diminution significative de la densité de neurones GAD- marqués pour *c-fos*, qui semble s'accompagner d'une augmentation du niveau d'expression de l'ARNm *c-fos* dans les neurones *c-fos*+/GAD- restants. Ces observations suggèrent l'existence de deux sous-populations distinctes au sein des neurones GAD-, qui pourraient être régulées de manière différentielle au cours du sevrage des opiacés (situation inconditionnée). Par

conséquent, nous avons mesuré la densité de grains d'argent dans chacun des neurones *c-fos* positifs (pour l'ensemble des animaux des groupes Sal et Nal120), et nous avons exprimé leur distribution de fréquence pour les neurones *c-fos*+/*GAD*- (Figure 37A) et les neurones *c-fos*+/*GAD*+ (Figure 37B).

En situation contrôle (groupe Sal), 562 neurones *GAD* négatifs présentent un marquage pour l'ARNm *c-fos* (Figure 37A, histogrammes gris clairs), alors que seulement 231 neurones *GAD* négatifs présentent un marquage *c-fos* après un sevrage précipité par 120 µg/kg de naloxone (groupe Nal120) (Figure 37A, histogrammes gris foncés). Cependant, la médiane de la densité de grains d'argent (Figure 37A, encart) augmente après un sevrage aigu pour atteindre 39.6 (25% et 75% percentile = 30.2 et 50.7 respectivement), par rapport à 14.6 (25% et 75% percentile = 11.4 et 19.9 respectivement) en situation contrôle (groupe Sal) (« *Mann Whitney test* » : $P < 0.0001$). Le test statistique de « *Kolmogorov-Smirnov* » révèle que les distributions de fréquence pour les neurones *c-fos*+/*GAD*- chez les animaux du groupes Nal120 par rapport au groupe Sal sont significativement différentes ($\chi^2 = 270.01$; $P < 0.0001$). L'ensemble de ces résultats indique qu'au sein des neurones *GAD* négatifs du BIA, au moins une sous-population est activée en terme d'expression de l'ARNm *c-fos* au cours du sevrage précipité par la naloxone, alors qu'une autre sous-population est au contraire inhibée.

Pour la population de neurones *GAD*+ (Figure 37B), le nombre de neurones exprimant l'ARNm *c-fos* n'est pas altéré de manière significative après un sevrage précipité par 120 µg/kg de naloxone ($n = 109$; Figure 37B, histogrammes gris foncés), par rapport à la situation contrôle ($n = 87$; Figure 37B, histogrammes gris clairs). Néanmoins, la médiane de la densité de grains d'argent dans ces neurones (Figure 37B, encart) augmente également après 120 µg/kg de naloxone pour atteindre 49.9 (25% et 75% percentile = 38.2 et 64.2 respectivement), par rapport à 13.6 (25% et 75% percentile = 10.8 et 19.6 respectivement) en situation contrôle (groupe Sal) (« *Mann Whitney test* » : $P < 0.0001$). Le test de « *Kolmogorov-Smirnov* » confirme l'existence de différences statistiquement significatives pour les neurones *c-fos*+/*GAD*-, entre les distributions de fréquence des groupes Nal120 et Sal ($\chi^2 = 97.764$; $P < 0.0001$). Ces données indiquent que la population GABAergique du BIA est activée de manière globale au cours du sevrage.

II.3. Discussion

Cette partie de notre étude examine l'expression de *c-fos* dans des neurones phénotypiquement identifiés de la VTA et des noyaux central (CeA) et basolatéral (BIA) de l'amygdale après un syndrome de sevrage aigu précipité par la naloxone dans un environnement spécifique (un des compartiments du « *Y-maze* »), et après réexposition à des stimuli environnementaux auparavant associés au syndrome de sevrage des opiacés. Dans la VTA, la majorité des neurones GABAergiques ainsi qu'environ 15% des neurones dopaminergiques présentent une augmentation d'expression de l'ARNm *c-fos* dans les deux situations expérimentales. Dans le BIA, si de nombreux neurones glutamatergiques sont inhibés au cours du sevrage aigu, certains autres présentent au contraire une augmentation de l'expression de *c-fos*. La réexposition aux stimuli conditionnés au sevrage des opiacés induit l'ARNm *c-fos* dans de nombreux neurones glutamatergiques du BIA. Dans

les neurones GABAergiques du CeA, les réponses *c-fos* sont opposées, puisqu'une intense induction est détectée dans la situation inconditionnée et que l'expression de l'ARNm *c-fos* est diminuée dans la situation conditionnée.

II.3.1. Effet du sevrage aigu et des stimuli conditionnés au sevrage dans des neurones identifiés de la VTA

Nous montrons que la majorité des neurones GABAergiques de la VTA présente une augmentation de l'expression de l'ARNm *c-fos* après un syndrome de sevrage de la morphine précipité de manière aiguë par 120 µg/kg de naloxone (comme dans l'étude présentée dans le Chapitre 1), mais également après la réexposition des animaux aux stimuli environnementaux précédemment associé au sevrage des opiacés. Dans nos conditions expérimentales, il nous a été impossible de mesurer directement une éventuelle diminution de l'activité *c-fos* dans les neurones dopaminergiques, étant donné que le niveau d'expression basal de l'ARNm *c-fos* dans la VTA est extrêmement faible. Néanmoins, nos résultats sont en accord avec des données récentes montrant que l'expression de la protéine c-Fos est en effet augmentée dans la population non-dopaminergique de la VTA après un syndrome de sevrage aigu, alors que seule la transcription médiée par la séquence consensus CRE est inhibée dans les neurones dopaminergiques (Shaw-Lutchman *et al.*, 2002).

Par conséquent, l'augmentation de l'expression du gène *c-fos* dans les neurones GABAergiques pourrait refléter une augmentation de l'excitabilité de ces interneurons de la VTA (Bonci & Williams, 1997; Williams *et al.*, 2001), qui pourrait provoquer une inhibition de la population dopaminergique. En accord avec cette hypothèse, des résultats d'études électrophysiologiques et de microdialyse ont montré que l'activité de décharge électrique des neurones dopaminergiques de la VTA est profondément diminuée au cours du sevrage (Diana *et al.*, 1995; Georges & Aston-Jones, 2003), et que les niveaux extracellulaires de dopamine sont également diminués au niveau du noyau accumbens (Acquas *et al.*, 1991; Pothos *et al.*, 1991; Acquas & Di Chiara, 1992; Rossetti *et al.*, 1992).

De manière intéressante, nous montrons également et pour la première fois qu'une faible sous-population de neurones dopaminergiques de la VTA (environ 15%) est activée en terme d'expression de *c-fos* à la fois au cours du sevrage aigu et après réexposition aux stimuli associés au sevrage. Ces résultats soulignent que le syndrome de sevrage précipité par la naloxone et les stimuli qui lui sont associés seraient capables d'induire des réponses opposées dans deux sous-populations de neurones dopaminergiques de la VTA, qui pourraient projeter sur des aires limbiques différentes.

La proportion de neurones dopaminergiques activés étant relativement faible dans la VTA, ceci suggère fortement que cette sous-population de neurones ne projette pas vers l'Acb (puisque l'activité de la voie dopaminergique VTA/Acb est inhibée au cours du sevrage), mais certainement vers d'autres structures limbiques liées à la VTA (Swanson, 1982), parmi lesquelles le BIA serait un bon candidat (Freedman & Cassell, 1994; Brinley-Reed & McDonald, 1999). En effet, il a été montré d'une part que les niveaux extracellulaires de dopamine sont augmentés lors du sevrage dans le cortex préfrontal (Bassareo *et al.*, 1995), mais que cette dopamine libérée pourrait néanmoins ne pas provenir des neurones mésocorticolimbiques de la VTA, mais plutôt d'afférences noradrénergiques (Devoto *et al.*, 2002). D'autre part, l'augmentation de l'activité dopaminergique dans l'amygdale

apparaît comme un phénomène critique sous-tendant les processus de conditionnement aversifs (Coco *et al.*, 1992; Guarraci *et al.*, 1999a; Guarraci *et al.*, 1999b; Nader & Le Doux, 1999; Guarraci *et al.*, 2000). L'ensemble de ces données suggère que la sous-population de neurones dopaminergiques qui présente une induction de l'expression de *c-fos* dans nos deux situations expérimentales pourrait projeter sur les noyaux de l'amygdale. Par conséquent, nous proposons que des modifications de l'activité des neurones dopaminergiques de la VTA qui projettent sur l'amygdale pourraient contribuer à la modulation de processus d'apprentissage associatifs lors du sevrage précipité par la naloxone, mais également être impliquées dans la récupération des associations mises en mémoire au cours du conditionnement. Cependant, nous ne pouvons pas non plus exclure d'une part l'existence de mécanismes additionnels médiés par la dopamine dans d'autres structures du cerveau, ni d'autre part que d'autres systèmes de neurotransmetteurs puissent également concourir à de tels processus.

Un autre phénomène très intéressant émerge lorsque l'on compare les résultats de cette étude avec les données phénotypiques obtenues dans la VTA au cours d'un syndrome de sevrage précipité par des doses croissantes de naloxone (cf. § II.4., Chapitre 1). En effet, l'effet des stimuli conditionnés sur l'activité des neurones de la VTA est équivalent à l'effet du sevrage précipité par la plus forte dose de naloxone utilisée (120 µg/kg), et par conséquent l'effet conditionné est plus important que la réponse obtenue après l'injection de faibles doses de naloxone (i.e. 7.5 ou 15 µg/kg). Si l'on admet que la composante motivationnelle du sevrage est révélée à la fois par l'injection de faibles doses de naloxone d'une part (dans la situation inconditionnée), et d'autre part par l'effet des stimuli associés au sevrage des opiacés (dans la situation conditionnée), ceci suggère que les processus cellulaires mis en jeu dans la VTA lors du sevrage des opiacés, et qui sous-tendent les aspects motivationnels du sevrage, pourraient en fait être potentialisés au cours des sessions de conditionnement. En effet, les rats morphino-dépendants ont reçu des administrations répétées de naloxone au cours des différentes sessions de conditionnement et donc, ont expérimenté plusieurs syndromes de sevrages. Ce phénomène pourrait ainsi s'apparenter aux processus de sensibilisation de la transmission dopaminergique mésolimbique qui ont été largement décrits pour les propriétés appétitives des drogues d'abus lors de leur consommation chronique, et qui sont supposés être à la base de leurs propriétés addictives (pour revues : Robinson & Berridge, 1993, 2000).

II.3.2. Implication différentielle des neurones du CeA et du BIA dans la formation et le rappel de la « mémoire du sevrage »

Les réponses *c-fos* inconditionnées ont été mesurées après la première session de conditionnement (i.e. première association entre le sevrage de la morphine précipité par 120 µg/kg de naloxone et un environnement spécifique), et par conséquent pourraient révéler, au-delà de l'effet inconditionné du sevrage, la mise en place de processus d'apprentissage associatif permettant d'encoder la valeur « *incentive* » des stimuli environnementaux associés au sevrage des opiacés. En effet, l'aversion de place conditionnée peut être induite par une seule association entre un compartiment du « *Y-maze* » et le sevrage précipité par la naloxone (Stinus *et al.*, 1990), indiquant que le premier syndrome de sevrage est suffisant pour la formation d'une association entre l'état aversif ainsi généré et

l'environnement. En revanche, l'état produit par la réexposition aux stimuli environnementaux reflète la récupération des associations apprises lors du conditionnement.

Les populations neuronales composant le BIA sont bien connues et incluent des interneurons GABAergiques qui contrôlent l'activité de neurones efférents glutamatergiques (Pitkanen *et al.*, 1997). Notre analyse détaillée des réponses du BIA dans des neurones phénotypiquement identifiés montre que, si le nombre de neurones marqués pour *c-fos* diminue de manière globale dans la population glutamatergique après un sevrage précipité par la naloxone, le niveau d'expression de l'ARNm *c-fos* dans les neurones restants (estimé grâce au comptage des grains d'argent) est clairement augmenté. De plus, alors que la densité de neurones GABAergiques exprimant l'ARNm *c-fos* n'est pas altérée au cours du sevrage aigu, le niveau d'expression de l'ARNm *c-fos* par neurone est également induit dans cette population. Par conséquent, l'activité neuronale au sein du BIA, n'est pas globalement diminuée lors du sevrage aigu (comme supposé suite aux expériences de simple marquage), et nos résultats phénotypiques indiquent qu'au contraire une sous-population de neurones efférents du BIA pourrait être facilitée, alors qu'une autre sous-population serait effectivement inhibée lors du conditionnement aversif. Ceci pourrait aussi expliquer le fait que la réexposition aux stimuli environnementaux associés au sevrage induit également l'expression de *c-fos* spécifiquement dans la population glutamatergique du BIA.

Il a été montré récemment que la dopamine pourrait moduler des phénomènes de plasticité neuronale dans le BIA au cours de l'apprentissage associatif (Rosenkranz & Grace, 2002b; Bissiere *et al.*, 2003). Dans toute une série d'études concernant l'analyse des réponses électrophysiologiques des neurones efférents du BIA à des stimulations de différentes entrées corticales (préfrontales et sensorielles), Rosenkranz & Grace (1999, 2001, 2002a) ont également décrit un ensemble de mécanismes cellulaires par lesquels la dopamine pourrait augmenter le rapport signal/bruit sur une sous-population de neurones glutamatergiques du BIA, permettant ainsi aux entrées sensorielles significatives de piloter l'activité des neurones efférents du BIA. Les réponses que nous détectons dans le BIA en terme d'expression de l'ARNm *c-fos* au cours de la première session de conditionnement pourraient par conséquent refléter un tel mécanisme de filtrage, par lequel l'influence d'entrées sensorielles pourrait être facilitée dans une sous-population de neurones glutamatergiques du BIA. En effet, l'expression basale de *c-fos* détectée dans de nombreux neurones glutamatergiques du BIA dans la situation contrôle (chez les animaux morphino-dépendants du groupe Sal) pourrait refléter le traitement de nombreuses informations sensorielles en provenance de l'environnement (caractéristiques de la pièce du PAC, du compartiment du « *Y-maze* », etc...), mais qui ne possèdent pas de valeur affective particulière (« *saliency* »). En revanche, le fait qu'une grande partie des neurones glutamatergiques du BIA s'inhibe au cours du sevrage de la morphine, mais qu'en même temps, le niveau d'expression de l'ARNm *c-fos* soit fortement augmenté dans une sous-population de ces neurones, suggère que les informations associées au sevrage, qui possèdent une forte connotation émotionnelle aversive, pourraient être traitées de manière plus efficace par ces neurones efférents, avant d'être envoyées vers les structures de sortie du BIA (CeA et Acb), qui permettent de générer un comportement adapté (cf. § II.3.3., ci-dessous).

Le CeA appartient à un ensemble de structures limbiques sous-corticales qui forment l'« *extended amygdala* » (Alheid & Heimer, 1988; Heimer *et al.*, 1997a; Heimer *et al.*, 1997b), et qui partagent de nombreuses propriétés en terme de connexions et d'organisation neurochimique (pour revue : Cassell *et al.*, 1999). Lors de la dépendance et du sevrage, ce réseau neuronal est supposé participer au traitement d'informations multiples d'ordre émotionnelles (anxiété, stress) et motivationnelles (« *incentive-learning* ») (pour revues : Koob & Le Moal, 1997; Rodriguez de Fonseca & Navarro, 1998; Di Chiara, 1999; Everitt *et al.*, 2001). En accord avec cette hypothèse, des études d'imagerie des produits du gène *c-fos* supportent l'idée que l'« *extended amygdala* » pourrait représenter un substrat neurobiologique critique pouvant rendre compte des propriétés « *incentive* » et motivationnelles du sevrage (Gracy *et al.*, 2001; Frenois *et al.*, 2002). Nous montrons ici des réponses opposées dans les neurones GABAergiques du CeA. En effet, la densité de neurones *c-fos*+/*GAD*+ est fortement augmentée dans le CeA après un sevrage de la morphine aigu, mais diminuée lors de la réexposition des animaux conditionnés aux stimuli associés au sevrage. Le CeA est le principal noyau de sortie de l'amygdale et contient en majorité des neurones GABAergiques qui reçoivent les informations en provenance du BIA, via une interface inhibitrice (ITC). En effet, les neurones GABAergiques de l'ITC, intercalés entre le BIA et le CeA (Millhouse, 1986; Cassell *et al.*, 1999), génèrent une inhibition de type « *feed-forward* » sur les neurones du CeA (Royer *et al.*, 1999; Pare *et al.*, 2003). Par conséquent, les réponses *c-fos* que nous détectons dans le CeA pourraient en partie résulter des modifications de l'activité des neurones glutamatergiques du BIA, via les neurones de l'ITC (voir Figure 38).

II.3.3. Un modèle fonctionnel pour la formation et le rappel de la « mémoire du sevrage des opiacés »

De nombreuses données de la littérature indiquent que l'amygdale est nécessaire pour l'acquisition, la consolidation, la récupération, et l'expression d'un conditionnement aversif (pour revue : Aggleton, 2000). Le consensus dans ce domaine est que le BIA permet d'encoder les associations entre les stimuli conditionnés (CS) et inconditionnés (US), et de transférer ces informations vers le CeA qui ensuite organise l'expression de réponses conditionnées adaptées (Gabriel *et al.*, 2003). Il a été proposé que les processus cellulaires mis en jeu lors de l'encodage des associations entre le CS et l'US pourraient impliquer un phénomène de potentialisation à long terme au sein des neurones du BIA (pour revues : Davis *et al.*, 1994; Maren, 1999; Schafe *et al.*, 2001; Maren, 2003).

Nos données concernant la caractérisation phénotypique des neurones recrutés dans la VTA et le BIA, ainsi que l'intégration de données de la littérature ayant décrit les mécanismes par lesquels la dopamine peut moduler les phénomènes attentionnels et les processus d'apprentissage associatif dans le BIA, mais également l'influence des stimuli conditionnés sur la recherche compulsive de drogue (pour revues : Berke & Hyman, 2000; Grace & Rosenkranz, 2002; Shalev *et al.*, 2002; Rosenkranz & Grace, 2003), nous amène à proposer un modèle fonctionnel pour l'acquisition et la récupération de la « mémoire du sevrage des opiacés » (voir Figure 38). Dans ce modèle, la présentation contingente du syndrome de sevrage (naloxone, US) avec des stimuli environnementaux (pièce du PAC, CS) permettrait une facilitation médiée par la dopamine de la réponse d'une sous-population de neurones glutamatergiques efférents du BIA à l'information provenant d'afférences

sensorielles corticales (Figure 38B). D'après Rosenkranz & Grace (2001), la dopamine pourrait à la fois supprimer l'effet inhibiteur des interneurons GABAergiques du BIA (action présynaptique), et potentialiser les entrées sensorielles via un effet postsynaptique sur une sous-population de neurones glutamatergiques efférents du BIA. Cette procédure de conditionnement permet le transfert de l'état affectif aversif associé au sevrage de la morphine (US) vers des stimuli environnementaux (CS), mais pourrait également permettre de déterminer quel type de stimuli pourrait accéder aux structures de sortie du BIA (CeA et Acb).

Deux résultats majeurs nous permettent de penser qu'au cours de la répétition des sessions de conditionnement (entre la Figure 38B et la Figure 38C), ces processus cellulaires pourraient être renforcés et par conséquent recruter de plus en plus de neurones efférents du BIA, conduisant le système dans un état hypersensible au CS : ① l'effet des stimuli conditionnés sur les neurones de la VTA est équivalent à l'effet du sevrage précipité par une forte dose de naloxone (cf. § II.3.1, ci-dessus), et donc nettement supérieur à l'effet des faibles doses de naloxone (cf. Chapitre 1), ce qui suggère que les processus mis en jeu dans la VTA au cours de sevrages répétés pourraient se sensibiliser, et ② bien que la réponse de certains neurones glutamatergiques du BIA soit augmentée au cours du sevrage aigu (phénomène de filtre sélectif, cf. § II.3.2, ci-dessus), leur nombre est très inférieur au nombre de neurones réactivés par les stimuli conditionnés, suggérant que de plus en plus de neurones efférents du BIA pourraient être potentialisés au cours des sessions de conditionnement. Cette hypothèse permet de supposer que l'image *c-fos* dans le BIA après plusieurs syndromes de sevrage des opiacés pourrait être complètement différente de celle que nous obtenons après un seul sevrage précipité par la naloxone, à savoir une augmentation du niveau d'expression global de l'ARNm *c-fos*.

La simple réexposition au CS (stimuli environnementaux conditionnés) pourrait ainsi engager la réactivation des neurones efférents du BIA dont l'activité aurait été facilitée lors des sessions de conditionnement, et ceci, également par un processus faisant intervenir une modulation par la dopamine (pour revues : Grace & Rosenkranz, 2002; Shalev *et al.*, 2002), qui au final pourrait piloter la motivation à rechercher à nouveau la drogue, par le contrôle subtil des structures de sortie (« *extended amygdala* »).

II.4. Conclusions

L'addiction correspond à un désordre psychobiologique caractérisé par une tendance chronique à la rechute, et implique des processus d'ordre motivationnels, émotionnels, et liés à l'apprentissage et à la mémoire (pour revues : Everitt *et al.*, 1999; Robinson & Berridge, 2000). Il est globalement admis que, lors de la dépendance, de nombreuses adaptations se développent au sein des réseaux neuronaux de nombreuses structures limbiques, qui par ailleurs sous-tendent la mise en place de phénomènes motivationnels et d'apprentissage associatif au cours de la consommation de la drogue, conduisant l'ensemble du système dans un nouvel état pathologique (Koob & Le Moal, 2001). L'ensemble de ces neuroadaptations, ainsi que les mécanismes de plasticité et d'apprentissage associatif qui constituent d'importantes caractéristiques de la dépendance et du sevrage des opiacés, pourrait contribuer à la nature compulsive de l'abus de drogue et rendre compte de la vulnérabilité

persistante à la rechute (Stewart *et al.*, 1984; Self & Nestler, 1998; Berke & Hyman, 2000; Weiss *et al.*, 2001). Nos résultats concourent ainsi à la compréhension de ces processus et supportent l'idée que des modifications complexes de la transmission dopaminergique dans différentes régions limbiques pourraient contribuer aux phénomènes addictifs en perturbant les réseaux neuronaux qui régulent l'émotion, la motivation et la mémoire (Di Chiara, 1999; Volkow *et al.*, 2002).

☺☺☺

*Le travail présenté dans cette partie a donné lieu à l'écriture d'un article récemment soumis à Journal of Neurosciences : Frenois F., Stinus L., Di Blasi F., Cador M., Le Moine C. (2003) Neural circuits underlying opiate withdrawal memories. II. Phenotypical characterization shows differential involvement of subpopulations of VTA and amygdaloid neurons. **J Neurosci Soumis : #JN-RM-3195-03.***

☺☺☺

FIGURES ET TABLEAUX DU CHAPITRE 2

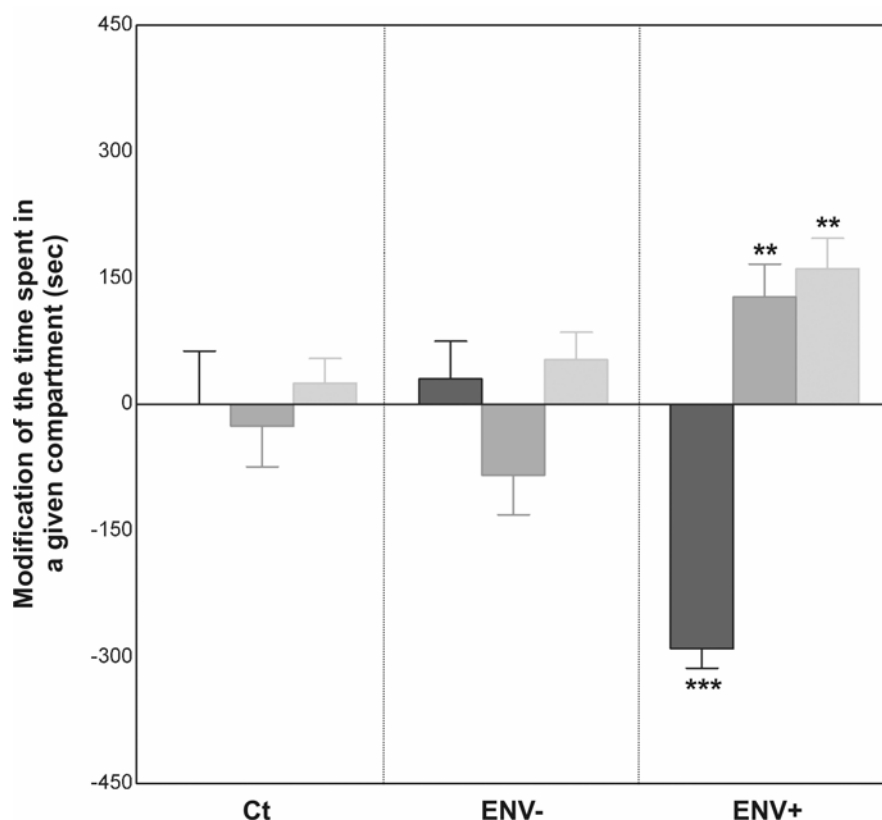


Figure 26. Mesure de l'aversion de place conditionnée induite par la naloxone chez des rats morphino-dépendants.

Le conditionnement a été réalisé par l'injection de 120 µg/kg de naloxone pour les animaux ENV+ (groupes ENV+/cs+ et ENV+/cs-), alors que les rats des groupes contrôle (Ct) et ENV- ont reçu du saline dans le « Y-maze ». Chaque histogramme représente les modifications du temps passé dans un compartiment donné du « Y-maze » pendant la phase de test par rapport à la phase de pré-conditionnement (moyennes ± SEM). Histogrammes noirs, compartiment associé à la naloxone (cs+); histogrammes gris foncés, compartiment associé au saline (cs-); histogrammes gris clairs, compartiment neutre. Pour les rats Ct et ENV-, qui n'ont jamais expérimenté le sevrage de la morphine dans la pièce du PAC, aucune aversion de place n'est mesurée pour aucun des compartiments du « Y-maze » (« *Wilcoxon matched pairs test* » : n.s. pour tous les compartiments). En revanche, les animaux ENV+ expriment une intense aversion de place conditionnée pour leur compartiment associé à la naloxone (-289.9 ± 23.0 sec; « *Wilcoxon matched pairs test* » : $P = 0.0005$) et évitent ce compartiment pour passer plus de temps de manière égale dans le compartiment associé au saline et le compartiment neutre (« *Wilcoxon matched pairs test* » : $P = 0.0078$ pour le compartiment associé au saline, et $P = 0.0021$ pour le compartiment neutre).

Brain Structure	UNCONDITIONED GROUPS		Unpaired t-test		CONDITIONED GROUPS				ANOVA	
	Sal (n=8)	Nal120 (n=8)	t _(df=14)	P	Ct (n=6)	ENV- (n=6)	ENV+/cs+ (n=8)	ENV+/cs- (n=8)	F _(3,24)	P
Macroscopic analysis										
Prelimbic cortex (PIC)	1269 ± 104	2137 ± 409	2.059	0.0586	1101 ± 149	1086 ± 142	1331 ± 228	1266 ± 94	0.528	0.6671
Cingulate cortex (CgC)	536 ± 69	831 ± 116*	2.180	0.0468	430 ± 79	392 ± 70	510 ± 95	471 ± 74	0.377	0.7706
Caudate-Putamen (CPu)	172 ± 21	353 ± 62*	2.763	0.0153	146 ± 24	121 ± 19	146 ± 24	138 ± 14	0.297	0.8275
Lateral septal nucleus (LS)	241 ± 36	1019 ± 114***	6.521	< 0.0001	213 ± 13	206 ± 8	173 ± 8	210 ± 16	2.564	0.0783
Microscopic analysis										
Accumbens nucleus										
Core (AcbC)	33 ± 3	90 ± 5***	9.423	< 0.0001	62 ± 6	66 ± 7	71 ± 5	82 ± 5	2.404	0.0924
Shell medial part (AcbS)	61 ± 8	326 ± 27***	9.477	< 0.0001	90 ± 16	74 ± 9	202 ± 21****	198 ± 21****	12.92	< 0.0001
Bed nucleus of the stria terminalis										
Dorsal part (BNSTd)	118 ± 9	631 ± 70***	7.253	< 0.0001	66 ± 4	71 ± 10	144 ± 11****	170 ± 9****	30.54	< 0.0001
Ventral part (BNSTv)	108 ± 11	654 ± 61***	8.875	< 0.0001	82 ± 9	80 ± 15	251 ± 22****	246 ± 30****	17.79	< 0.0001
Amygdala										
Basolateral nucleus (BIA)	144 ± 8	104 ± 14*	2.416	0.0299	102 ± 12	106 ± 9	186 ± 17****	175 ± 12****	10.10	0.0002
Central nucleus (CeA)	87 ± 8	491 ± 44***	9.049	< 0.0001	117 ± 16	95 ± 9	69 ± 10*	73 ± 9*	3.809	0.0230
Hypothalamic nuclei										
Lateral (LHA)	94 ± 14	279 ± 27***	5.874	< 0.0001	88 ± 11	70 ± 10	117 ± 12^	122 ± 11^	4.314	0.0155
Paraventricular (PVH)	167 ± 31	1229 ± 86***	10.93	< 0.0001	73 ± 8	60 ± 7	376 ± 60****	380 ± 69****	10.71	0.0002
Ventral tegmental area (VTA)	33 ± 4	119 ± 9***	8.616	< 0.0001	38 ± 5	30 ± 4	106 ± 8****	112 ± 13****	22.88	< 0.0001
Periaqueductal gray (PAG)	114 ± 9	197 ± 19**	4.074	0.0018	94 ± 8	100 ± 6	106 ± 4	108 ± 11	0.566	0.6437
Hippocampus										
CA1 hippocampic field	75 ± 8	333 ± 36***	6.913	< 0.0001	74 ± 3	78 ± 7	156 ± 30^	149 ± 16^	5.510	0.0073
CA3 hippocampic field	63 ± 6	218 ± 21***	7.019	< 0.0001	67 ± 5	70 ± 6	128 ± 8****	115 ± 11****	14.72	< 0.0001
Locus coeruleus (LC)	55 ± 10	718 ± 27***	22.80	< 0.0001	38 ± 7	40 ± 8	294 ± 55****	313 ± 42****	14.15	< 0.0001
Nucleus of the solitary tract (NTS)	183 ± 10	459 ± 57***	4.795	0.0003	184 ± 18	184 ± 17	205 ± 20	205 ± 23	0.372	0.7738

Tableau 3. Mesure quantitative de l'expression de l'ARNm *c-fos* dans l'ensemble des structures analysées, après un sevrage aigu précipité par la naloxone (groupes inconditionnés) ou après réexposition aux stimuli associés au sevrage (groupes conditionnés).

Les valeurs représentent les moyennes ± SEM de la densité optique (exprimé en unité arbitraire de radioactivité) pour l'analyse macroscopique, et les moyennes ± SEM de la densité de neurones *c-fos* positifs par mm² pour l'analyse microscopique. Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant un t-test non apparié dans la situation inconditionnée [**, P* < 0.05 ; ****, P* < 0.001 versus contrôle (groupe Sal)], et en utilisant une ANOVA suivie du test *post hoc* « Newman-Keuls multiple comparison test » (**, P* < 0.05 ; ***, P* < 0.01 ; ****, P* < 0.001 versus groupe Ct - ^*, P* < 0.05 ; ^^*, P* < 0.01 ; ^^*, P* < 0.001 versus groupe ENV-).

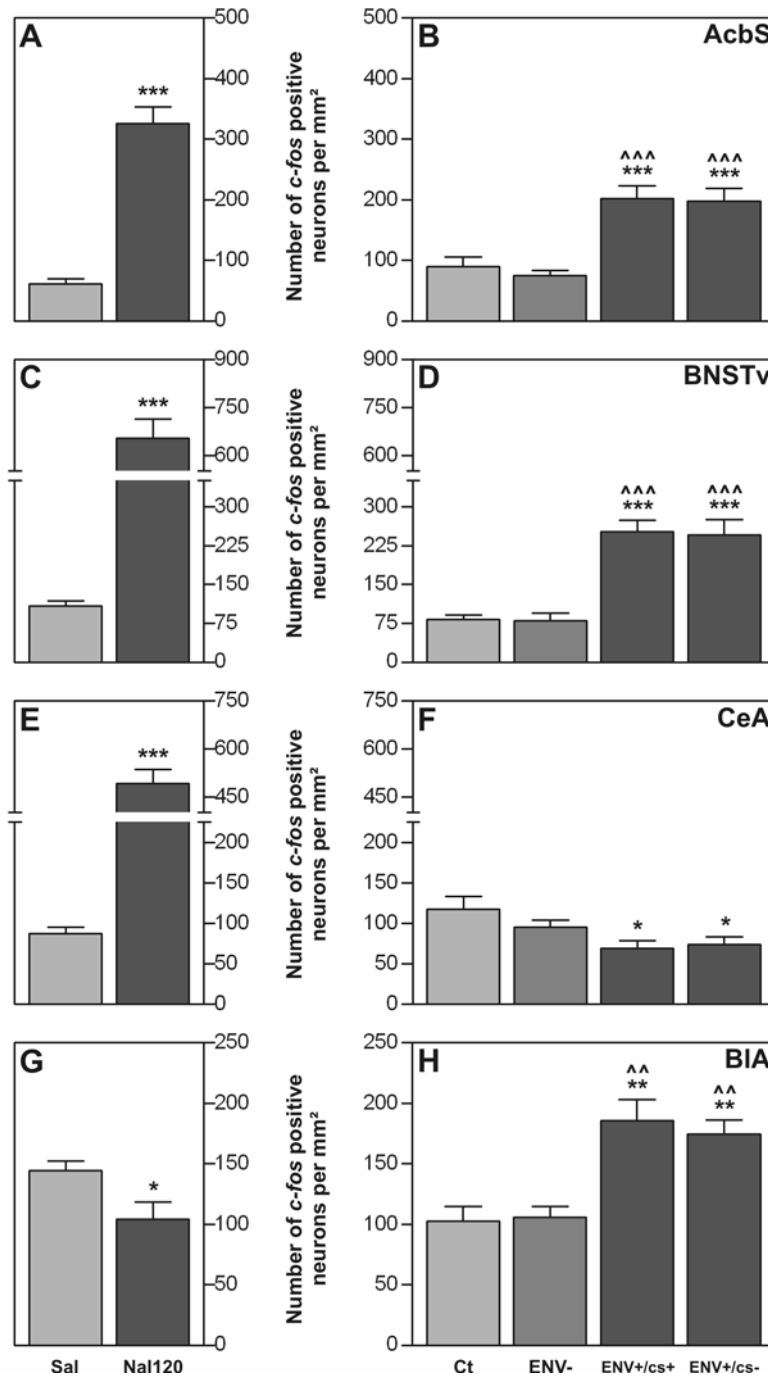


Figure 27. Quantification dans les structures de l'« *extended amygdala* » (AcbS, BNSTv et CeA) et dans le BIA, comparant les réponses *c-fos* inconditionnées et conditionnées.

Les histogrammes montrent les variations de l'expression de l'ARNm *c-fos* après un sevrage aigu précipité par 120 µg/kg de naloxone (A, C, E et G), et après re-exposition aux stimuli environnementaux associés au syndrome de sevrage des opiacés (B, D, F et H). Chaque histogramme représente les moyennes ± SEM de la densité de neurones *c-fos* positifs par mm². Le nombre de neurones *c-fos* positif est augmenté dans l'AcbS (A et B) et le BNSTv (C et D) après exposition à l'environnement auparavant associé au sevrage (groupes ENV+/cs+ et ENV+/cs-) (ANOVA : $P < 0.0001$ pour les deux structures. « *Newman-Keuls multiple comparison test* » : ***, $P < 0.001$ versus groupe Ct – ^^^, $P < 0.001$ versus groupe ENV-), ou après un sevrage de la morphine aigu (groupe Nal120) (t-test non apparié : ***, $P < 0.0001$ pour les deux structures versus groupe Sal). Dans l'amygdale (E–H), les niveaux d'ARNm *c-fos* sont augmentés dans le CeA (E), mais diminués dans le BIA (G) après un sevrage précipité par la naloxone (groupe Nal120) (t-test non apparié : ***, $P < 0.0001$ pour le CeA ; *, $P = 0.0299$ pour le BIA versus groupe Sal). Au contraire, dans la situation conditionnée, l'expression de *c-fos* est augmentée dans le BIA (H), mais diminuée dans le CeA (F) après réexposition aux stimuli environnementaux associés au sevrage (groupes ENV+/cs+ et ENV+/cs-) (ANOVA : $P = 0.0002$ pour le BIA ; $P = 0.0230$ pour le CeA. « *Newman-Keuls multiple comparison test* » : *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ versus groupe Ct – ^^, $P < 0.01$ versus groupe ENV-). Il n'y a pas de différence significative en terme d'expression de *c-fos* entre les animaux ENV+/cs+ et ENV+/cs-, dans toutes les structures analysées (« *Newman-Keuls multiple comparison test* » : n.s. pour toutes les structures).

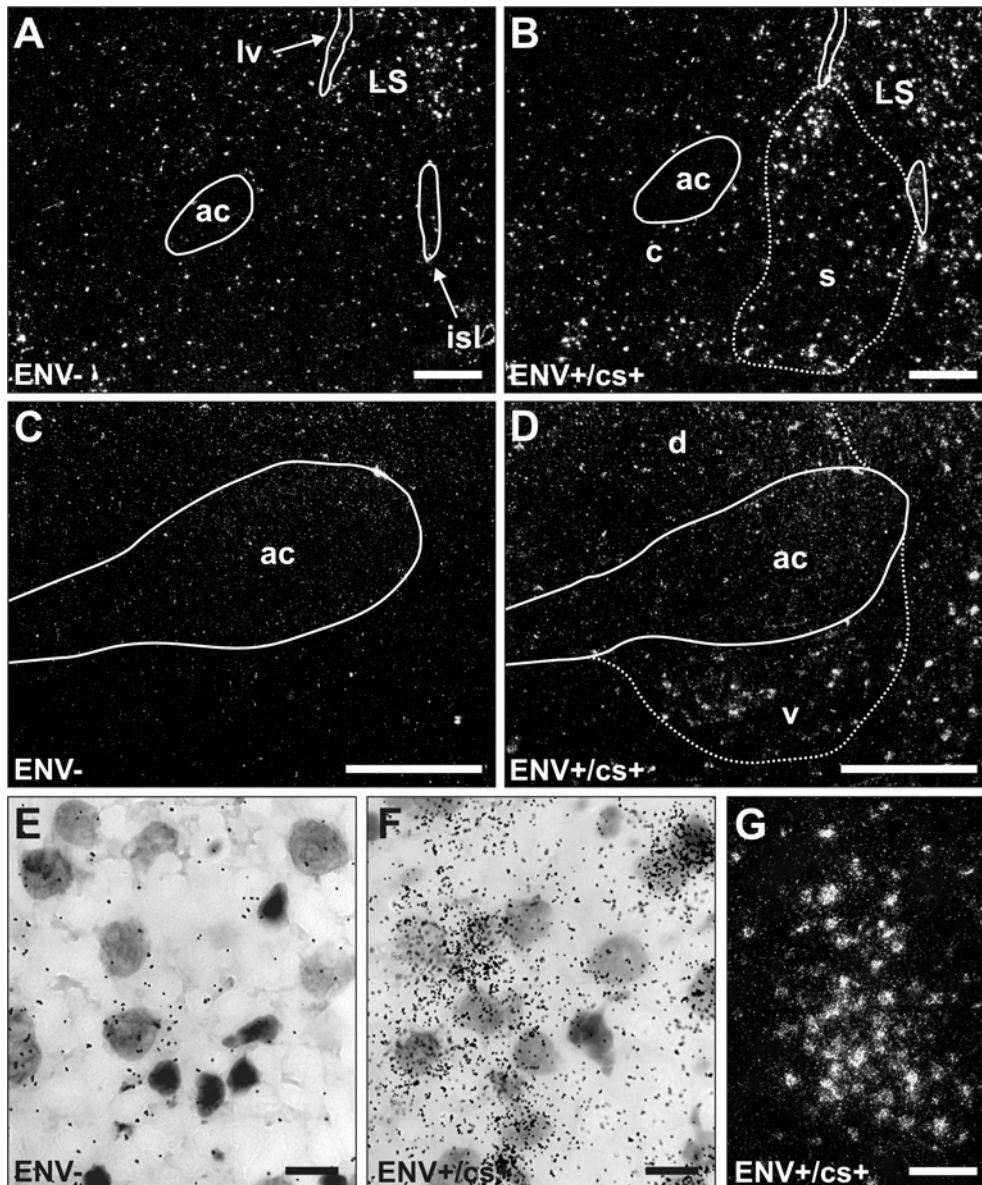


Figure 28. Illustration des réponses *c-fos* conditionnées dans l'Acb, le BNST, et le locus coeruleus. (A–D et G) Microphotographies en fond noir au niveau de l'Acb (A et B), du BNST (C et D) et du locus coeruleus (G), montrant le niveau basal d'expression de l'ARNm *c-fos* chez les animaux ENV- (A et C), et l'augmentation conditionnée de l'expression de l'ARNm *c-fos* induit par la réexposition des rats ENV+/cs+ à l'environnement associé au sevrage (B, D et G). Les neurones présentant une induction de *c-fos* apparaissent en blanc. Les lignes en pointillé délimitent les sous-régions anatomiques. LS, septum latéral ; c, AcbC ; s, AcbS ; v, BNSTv ; d, BNSTd ; ac, commissure antérieure ; isl, îlots de Calleja ; lv, ventricule latéral. Dans l'Acb, une intense augmentation conditionnée de l'expression de *c-fos* est détectée dans la partie shell (B), mais pas dans la partie core (située juste autour de la commissure antérieure). La partie ventrale du BNST présente une induction conditionnée de l'ARNm *c-fos* plus intense que la partie dorsale (D). (E et F) Microphotographies en fort grossissement montrant l'induction conditionnée de l'expression de *c-fos* (grains d'argent noir) dans les neurones du locus coeruleus (marquage gris clair) des animaux ENV+/cs+ (F), par rapport aux animaux ENV- (E). Barres d'échelle, 1 mm (A–D), 250 μ m (G), 20 μ m (E et F).

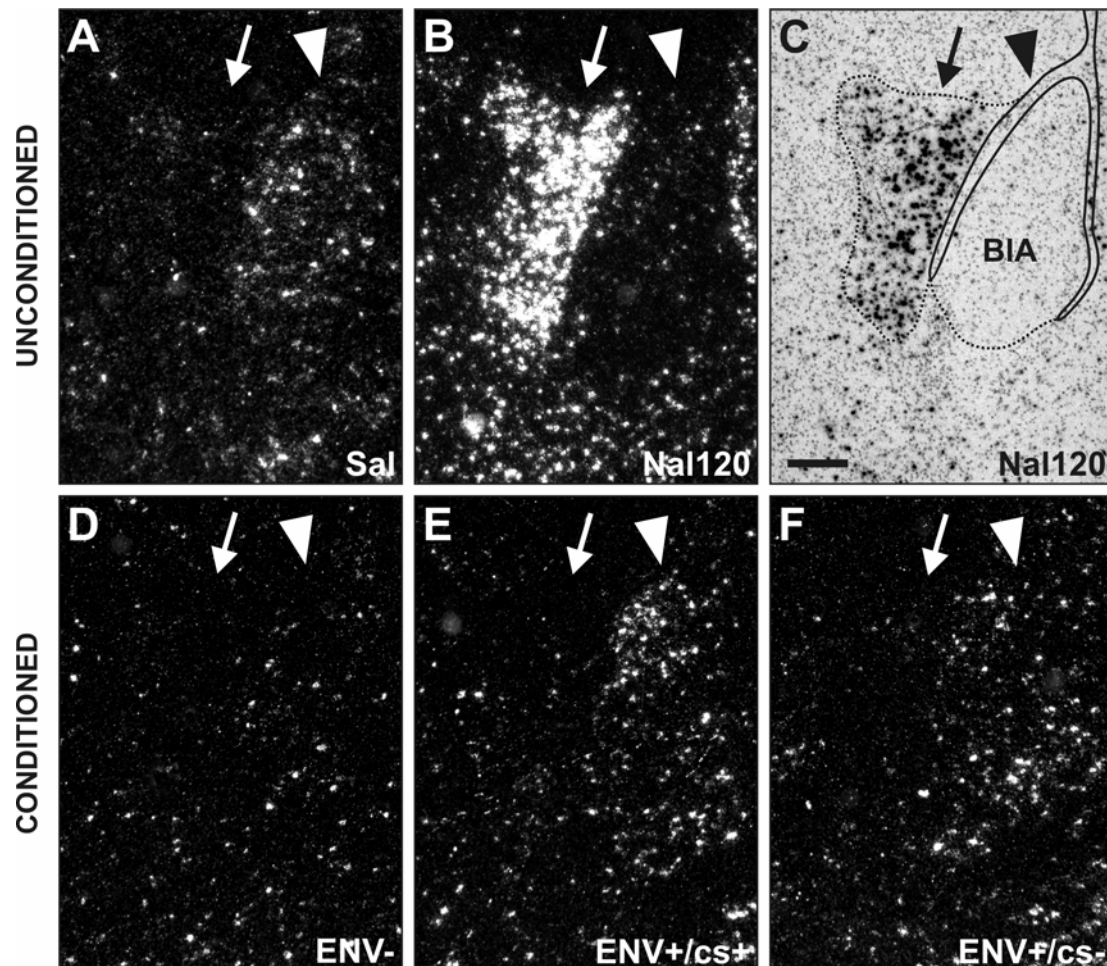


Figure 29. Comparaisons entre les réponses *c-fos* conditionnées et l'expression de l'ARNm *c-fos* induit par la naloxone dans les noyaux central et basolatéral de l'amygdale.

Microphotographies en fond noir montrant le marquage *c-fos* dans l'amygdale des animaux inconditionnés (A et B) et conditionnés (D–F). Les neurones marqués apparaissent en blanc. Les têtes de flèche pointent sur le noyau basolatéral (BIA) et les flèches pointent sur le noyau central de l'amygdale (CeA). (C) Microphotographie en fond clair correspondant à la coupe montrée en B, et délimitant les différentes sous-divisions quantifiées dans l'amygdale. Le niveau basal d'ARNm *c-fos* est plus élevé dans le BIA que dans le CeA chez les animaux inconditionnés du groupe Sal (A), alors qu'il n'y a plus de différence de marquage entre ces deux noyaux chez les animaux conditionnés (D), ce qui suggère un effet possible des sessions de conditionnement au niveau du BIA. Après un syndrome de sevrage précipité par une dose de 120 µg/kg de naloxone, les niveaux d'expression de l'ARNm *c-fos* sont fortement augmentés dans le CeA (en particulier dans la partie capsulaire), mais diminués dans le BIA (B). Au contraire, les rats ENV+/cs+ (E) et ENV+/cs- (F) présentent une augmentation conditionnée de l'expression de *c-fos* de même intensité dans le BIA après réexposition aux stimuli environnementaux associés au sevrage. En revanche, les niveaux d'ARNm *c-fos* sont diminués dans le CeA des animaux conditionnés (ENV+/cs+ et ENV+/cs-). Barre d'échelle, 500 µm.

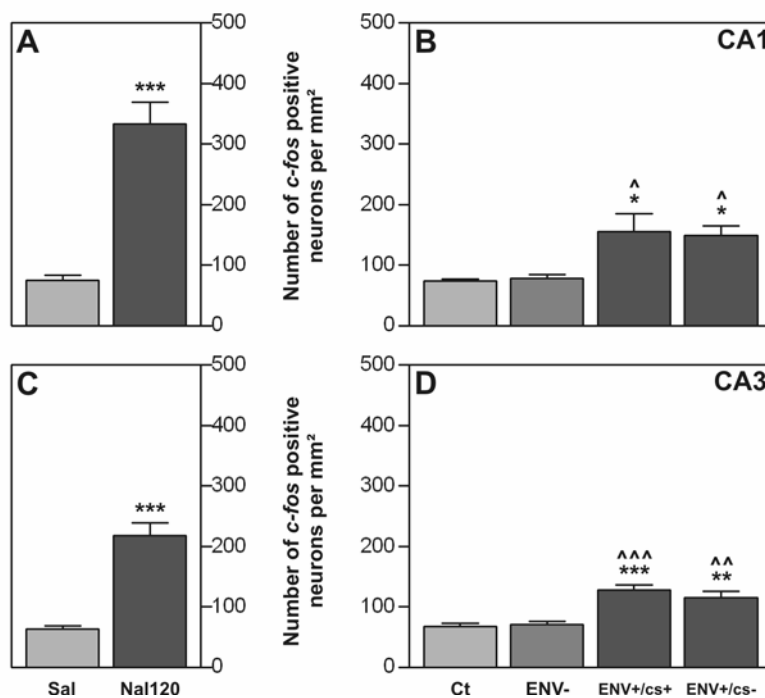


Figure 30. Mesures quantitatives comparant les réponses *c-fos* conditionnées et l'expression de *c-fos* induit par la naloxone dans l'hippocampe.

Chaque histogramme représente les moyennes \pm SEM de la densité de neurones *c-fos* positifs par mm^2 dans les champs CA1 (A et B) et CA3 (C et D) de l'hippocampe. Les niveaux d'expression de *c-fos* sont augmentés dans les deux champs de l'hippocampe après réexposition aux stimuli associés au sevrage (B et D, groupes ENV+/cs+ et ENV+/cs-) (ANOVA : $P = 0.0073$ pour CA1 ; $P < 0.0001$ pour CA3). « Newman-Keuls multiple comparison test » : *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ versus groupe Ct – ^, $P < 0.05$; ^^, $P < 0.01$; ^^, $P < 0.001$ versus groupe ENV-, ou après un sevrage de la morphine aigu (A et C, groupe Nal120) (t-test non apparié : ***, $P < 0.0001$ pour les deux structures versus groupe Sal). Cependant, il n'y a pas de différence significative en terme d'expression de *c-fos* entre les animaux ENV+/cs+ et ENV+/cs-, ni dans le champ CA1, ni dans CA3 (« Newman-Keuls multiple comparison test » : n.s. pour les deux structures).

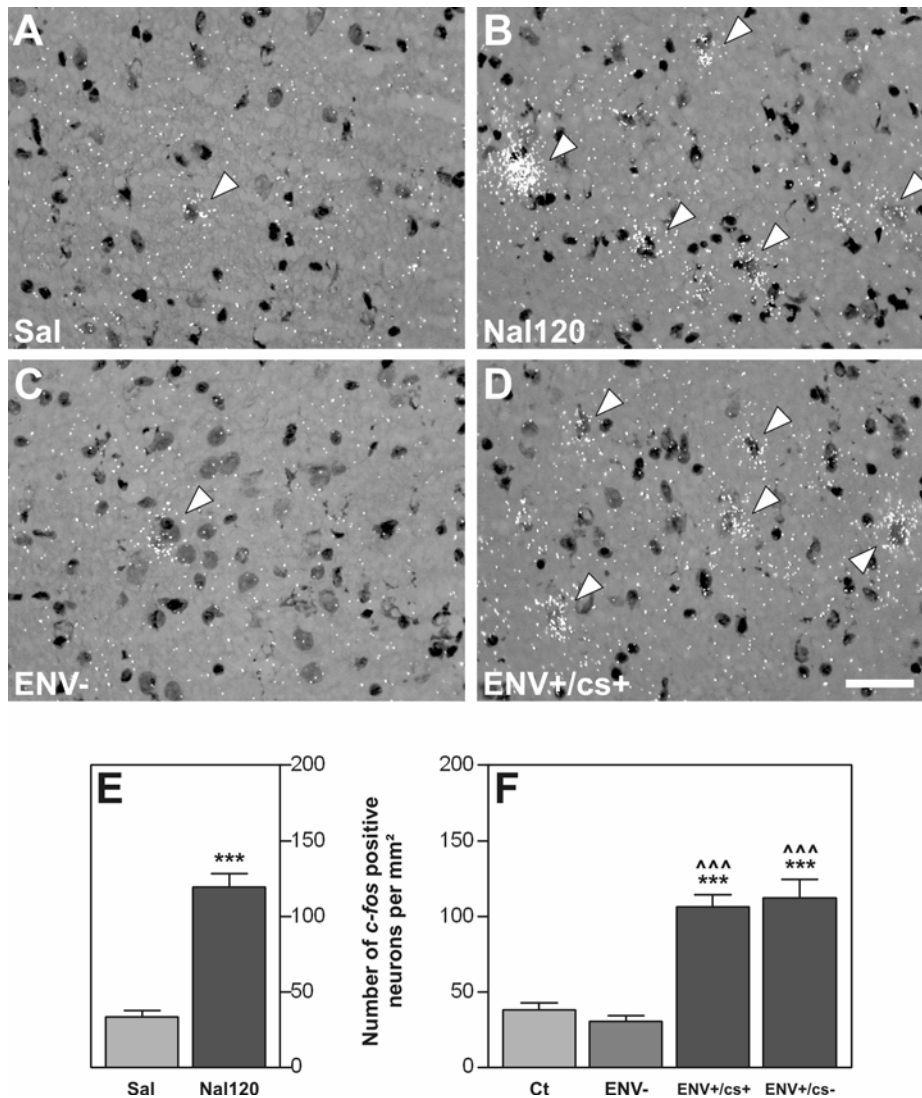


Figure 31. Comparaison de l'expression de l'ARNm *c-fos* dans l'aire tegmentale ventrale après un sevrage précipité par la naloxone, ou après réexposition aux stimuli associés au sevrage.

(A–D) Microphotographies illustrant les réponses *c-fos* (grains d'argent épifluorescents) dans les situations inconditionnées (A et B) et conditionnées (C et D). (E et F) Histogramme représentant les moyennes \pm SEM de la densité de neurones *c-fos* positifs par mm² dans les situations inconditionnée (E) et conditionnée (F). En conditions basales, les niveaux d'expression de l'ARNm *c-fos* sont très faibles dans la VTA et ne varient pas entre les rats conditionnés (groupe ENV-) et inconditionnés (groupe Sal). La densité de neurones exprimant l'ARNm *c-fos* est fortement augmentée chez les animaux conditionnés réexposés aux stimuli environnementaux associés au sevrage (groupes ENV+/cs+ et ENV+/cs-) (ANOVA : $P < 0.0001$. « Newman-Keuls multiple comparison test » : ***, $P < 0.001$ versus groupe Ct – ^^, $P < 0.001$ versus groupe ENV-), et les animaux inconditionnés (groupe Nal120) (t-test non apparié : ***, $P < 0.0001$ versus groupe Sal). Les niveaux d'induction sont équivalents dans les deux situations (inconditionnée et conditionnée), et il n'y a pas de différence significative en terme d'expression de *c-fos* entre les animaux ENV+/cs+ et ENV+/cs- (« Newman-Keuls multiple comparison test » : n.s.). Barre d'échelle, 50 μ m.

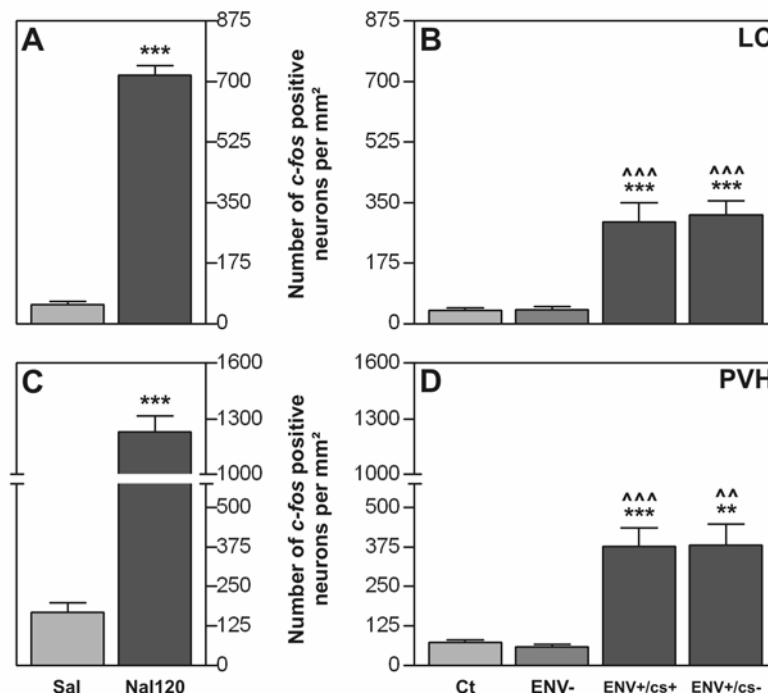


Figure 32. Histogrammes montrant l'expression de l'ARNm *c-fos* dans le locus coeruleus et le PVH induit par la réexposition aux stimuli associés au sevrage des opiacés, ou par un sevrage précipité par 120 µg/kg de naloxone.

Chaque histogramme représente les moyennes ± SEM de la densité de neurones *c-fos* positifs par mm² dans le locus coeruleus (A et B) et le PVH (C et D) dans les situations inconditionnée (A et C) et conditionnée (B et D). La densité de neurones *c-fos* positifs par mm² est augmentée dans les deux structures après réexposition aux stimuli associés au sevrage (groupes ENV+/cs+ et ENV+/cs-) (ANOVA : $P < 0.0001$ pour le LC ; $P = 0.0002$ pour le PVH). « Newman-Keuls multiple comparison test » : **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ versus groupe Ct – ^, $P < 0.01$; ^^, $P < 0.001$ versus groupe ENV-, ou après un sevrage de la morphine aigu (A et C, groupe Nal120) (t-test non apparié : ***, $P < 0.0001$ pour les deux structures versus groupe Sal). Cependant, il n'y a pas de différence significative en terme d'expression de *c-fos* entre les animaux ENV+/cs+ et ENV+/cs-, ni dans le LC, ni dans le PVH (« Newman-Keuls multiple comparison test » : n.s. pour les deux structures).

Brain Structure	UNCONDITIONED GROUPS		Unpaired t-test		CONDITIONED GROUPS			ANOVA		
	Sal (n=8)	Nal120 (n=8)	t _(df=14)	P	Ct (n=6)	ENV- (n=6)	ENV+/cs+ (n=8)	ENV+/cs- (n=8)	F _(3,24)	P
Ventral tegmental area (VTA)	23 ± 3	120 ± 14***	6.818	< 0.0001	36 ± 6	26 ± 3	99 ± 11****^	104 ± 15****^	14.29	< 0.0001
Amygdala										
Basolateral nucleus (BIA)	201 ± 27	75 ± 10**	4.721	0.0011	132 ± 7	124 ± 11	228 ± 26****^	199 ± 9****^	11.31	0.0001
Central nucleus (CeA)	59 ± 2	791 ± 40***	16.65	< 0.0001	130 ± 9	112 ± 3	98 ± 6*	99 ± 7*	4.748	0.0117

Tableau 4. Mesure quantitative de la densité globale de neurones *c-fos* positifs dans la VTA et l'amygdale, après un sevrage précipité par la naloxone (groupes inconditionnés) ou après réexposition aux stimuli associés au sevrage (groupes conditionnés).

Les valeurs représentent les moyennes ± SEM de la densité de neurones *c-fos* positifs par mm². Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant un t-test non apparié dans la situation inconditionnée (**, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ versus contrôle (groupe Sal)), et en utilisant une ANOVA suivie du test *post hoc* « Newman-Keuls multiple comparison test » (**, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ versus groupe Ct – ^, $P < 0.05$; ^^, $P < 0.01$; ^^, $P < 0.001$ versus groupe ENV-).

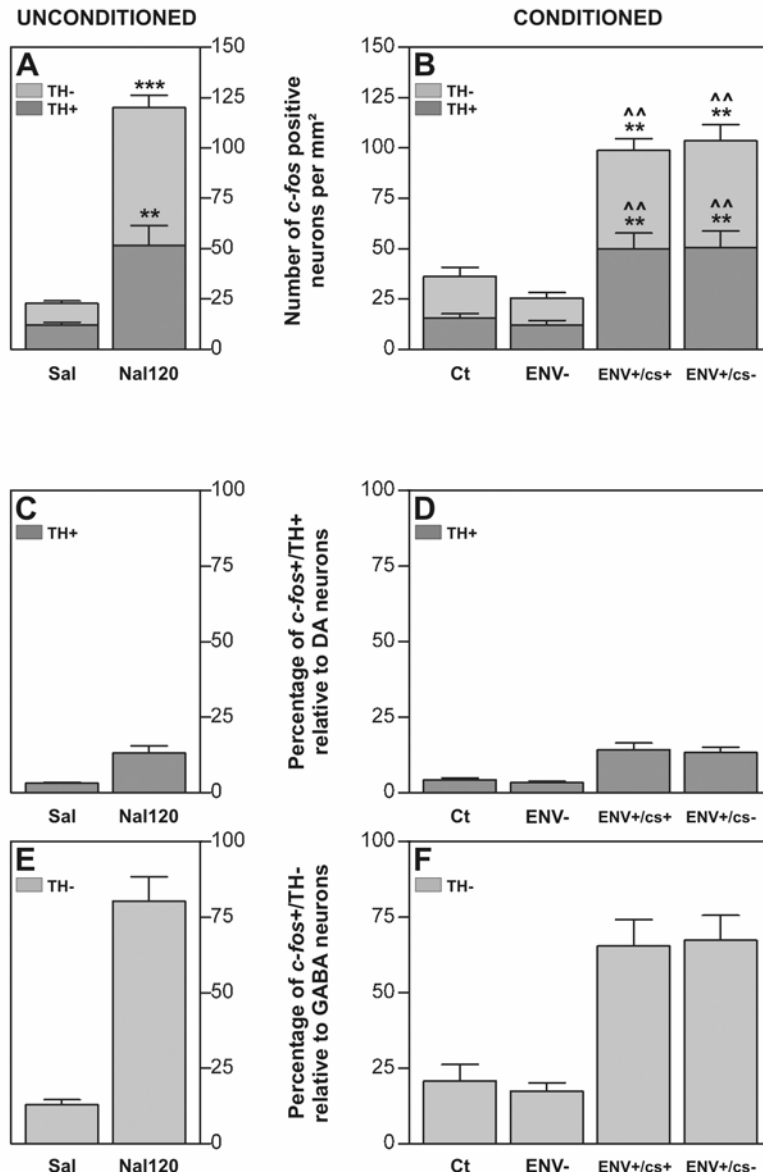


Figure 33. Quantification de l'expression de l'ARNm *c-fos* dans des neurones phénotypiquement identifiés de la VTA, après un sevrage aigu précipité par la naloxone ou après réexposition aux stimuli environnementaux associés au sevrage.

(A et B) Histogrammes cumulatifs représentant les moyennes ± SEM de la densité de neurones *c-fos* positifs par mm², dans les neurones TH+ (histogrammes gris foncés) et TH- (histogrammes gris clairs). Le nombre total de neurone *c-fos* positif est représenté par la somme des histogrammes gris foncé et gris clair. Les niveaux d'expression de l'ARNm *c-fos* sont augmentés dans les deux populations neuronales (TH+ et TH-) après un sevrage de la morphine aigu (A, groupe Nal120) (t-test non apparié : **, $P < 0.01$ pour *c-fos*/TH+ ; ***, $P < 0.0001$ pour *c-fos*/TH- versus groupe Sal), ou après réexposition aux stimuli associés au sevrage (B, groupes ENV+/cs+ et ENV+/cs-) (ANOVA : $P < 0.0003$ pour les deux populations neuronales. « Newman-Keuls multiple comparison test » : **, $P < 0.01$ versus groupe Ct – ^^, $P < 0.01$ versus groupe ENV-). Les inductions inconditionnées et conditionnées de l'expression de *c-fos* sont équivalentes dans les populations TH+ et TH- et chaque population représente environ la moitié du nombre total de neurones *c-fos* marqués. Il n'y a pas de différence significative en terme d'expression de *c-fos* entre les animaux ENV+/cs+ et ENV+/cs-, ni dans la population TH+, ni dans la population TH- (« Newman-Keuls multiple comparison test » : n.s. pour les deux populations).

(C–F) Pourcentage de neurones doublement marqués par rapport à la population totale des neurones TH+, dopaminergiques (C et D) ou à la population totale des neurones TH-, GABAergiques (E et F), dans les situations inconditionnée (C et E) ou conditionnée (D et F). Alors qu'une faible proportion des neurones de la population TH+ présente une induction de l'ARNm *c-fos* dans les situations inconditionnée (13 ± 2% pour le groupe Nal120) et conditionnée (14 ± 2% pour le groupe ENV+/cs+ et 13 ± 2% pour le groupe ENV+/cs-), la majorité des neurones GAD+ présentent également un marquage pour l'ARNm *c-fos* après un sevrage de la morphine aigu (80 ± 8% pour le groupe Nal120) ou après réexposition aux stimuli associés au sevrage (65 ± 9% pour le groupe ENV+/cs+ et 67 ± 8% pour le groupe ENV+/cs-).

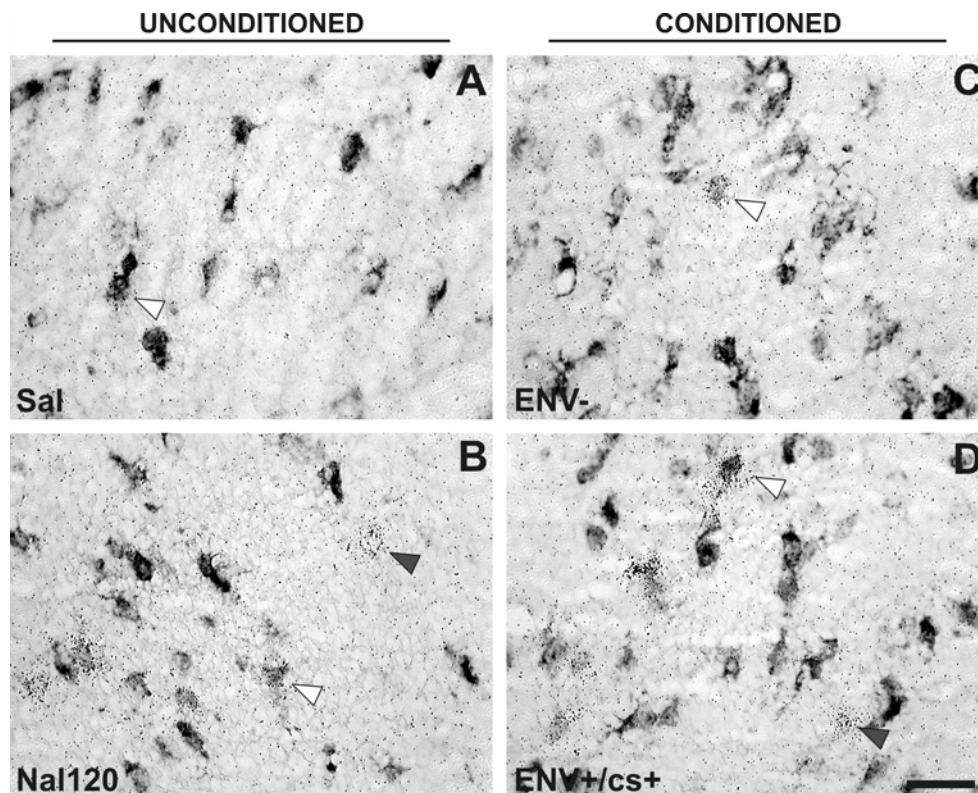


Figure 34. Caractérisation phénotypique des neurones de la VTA qui expriment l'ARNm *c-fos* après un sevrage précipité par la naloxone ou après réexposition aux stimuli environnementaux associés au sevrage.

L'expérience de double hybridation *in situ* permet de détecter sur le même matériel l'ARNm TH avec une sonde froide (marquage gris foncé) et l'ARNm *c-fos* avec une sonde radioactive (grains d'argent). En condition basale, très peu de neurones présentent un marquage *c-fos* que ce soit en situation inconditionnée (A) et conditionnée (C) (têtes de flèches). Le syndrome de sevrage précipité par la naloxone (B) ainsi que la réexposition aux stimuli environnementaux associés au sevrage (D) provoquent une intense augmentation de l'expression de l'ARNm *c-fos* dans les neurones TH positifs (têtes de flèches blanches) et TH négatifs (têtes de flèches grises). L'induction de l'ARNm *c-fos* ne s'effectue pas dans toute la population dopaminergique, car de nombreux neurones TH+ ne montrent aucun marquage *c-fos* dans les deux situations (inconditionnée et conditionnée). Barre d'échelle, 50 μ m.

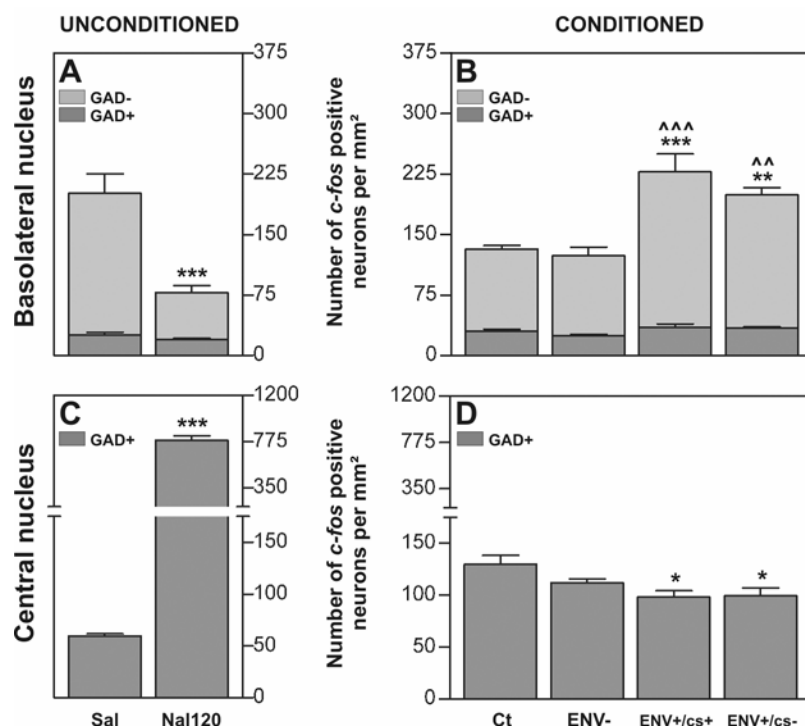


Figure 35. Quantification de l'expression de l'ARNm *c-fos* dans des neurones phénotypiquement identifiés du BIA et du CeA, après un sevrage aigu précipité par la naloxone ou après réexposition aux stimuli environnementaux associés au sevrage.

(A et B) Histogrammes cumulatifs représentant les moyennes \pm SEM de la densité de neurones *c-fos* positifs par mm^2 , dans les neurones GAD+ (histogrammes gris foncés) et GAD- (histogrammes gris clairs) du BIA. Le nombre de neurone exprimant l'ARNm *c-fos* est diminué dans la population GAD- du BIA après un sevrage précipité par 120 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de naloxone (A, groupe Nal120) (t-test non apparié : ***, $P = 0.0011$ versus groupe Sal), mais au contraire augmenté après réexposition aux stimuli associés au sevrage (B, groupes ENV+/cs+ et ENV+/cs-) (ANOVA : $P < 0.0003$. « Newman-Keuls multiple comparison test » : **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ versus groupe Ct – ^, $P < 0.01$; ^^^, $P < 0.001$ versus groupe ENV-). En revanche, le nombre de neurones *c-fos*/GAD+ ne varie pas que ce soit dans la situation inconditionnée (groupe Nal120) (t-test non apparié : n.s.) ou dans la situation conditionnée (ANOVA : $P < 0.0477$. « Newman-Keuls multiple comparison test » : n.s. pour tous les groupes). (C et D) Chaque histogramme représente les moyennes \pm SEM de la densité de neurones *c-fos* positifs par mm^2 , dans les neurones GAD+ du CeA. Le nombre de neurones doublement marqués est fortement augmenté après un sevrage précipité par la naloxone (C, groupe Nal120) (t-test non apparié : ***, $P < 0.0001$ versus groupe Sal), mais au contraire diminué après réexposition aux stimuli associés au sevrage (D, groupes ENV+/cs+ et ENV+/cs-) (ANOVA : $P = 0.0117$. « Newman-Keuls multiple comparison test » : *, $P < 0.05$ versus groupe Ct). Il n'y a pas de différence significative en terme d'expression de *c-fos* entre les animaux ENV+/cs+ et ENV+/cs-, ni dans le BIA, ni dans le CeA (« Newman-Keuls multiple comparison test » : n.s. pour les deux structures).

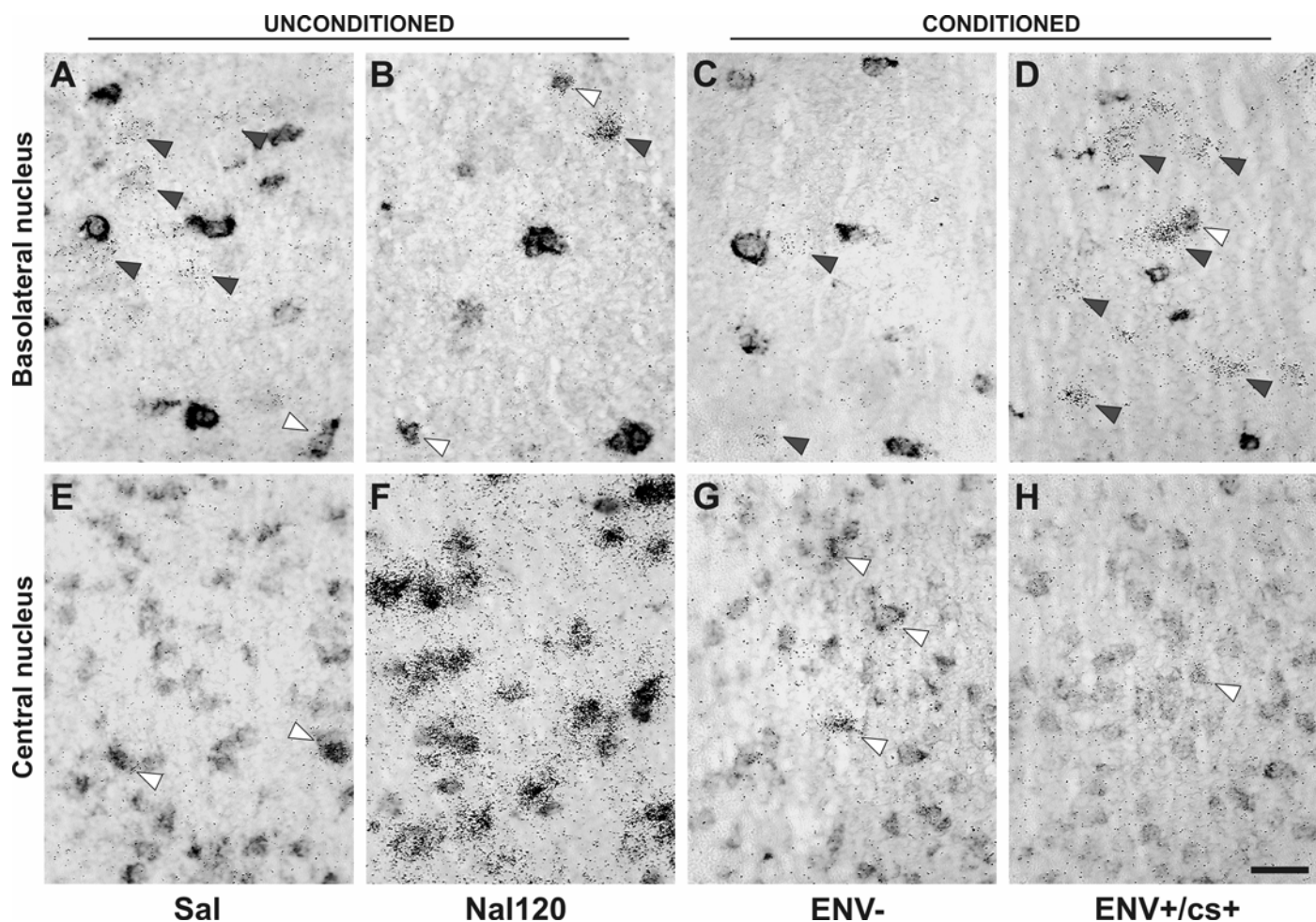


Figure 36. Illustration des patterns de variation de l'expression de *c-fos* opposés détectés dans les neurones phénotypiquement identifiés du BIA et du CeA après un sevrage aigu précipité par la naloxone ou après réexposition aux stimuli environnementaux associés au sevrage.

L'expérience de double hybridation *in situ* permet de détecter sur le même matériel l'ARNm GAD/67 avec une sonde froide (marquage gris foncé) et l'ARNm *c-fos* avec une sonde radioactive (grains d'argent). Les cellules marquées en gris correspondent aux interneurons GABAergiques dans le BIA (A–D), et aux neurones épineux de taille moyenne du CeA (neurones efférents), qui sont GABAergiques (E–H). Les têtes de flèche blanches pointent sur des neurones doublement marqués pour les ARNm *c-fos* et GAD/67, et les têtes de flèches grises pointent sur des neurones simplement marqués pour *c-fos*, et qui correspondent aux neurones glutamatergiques du BIA (neurones efférents). Voir texte pour plus d'explications. Barre d'échelle, 50 μ m.

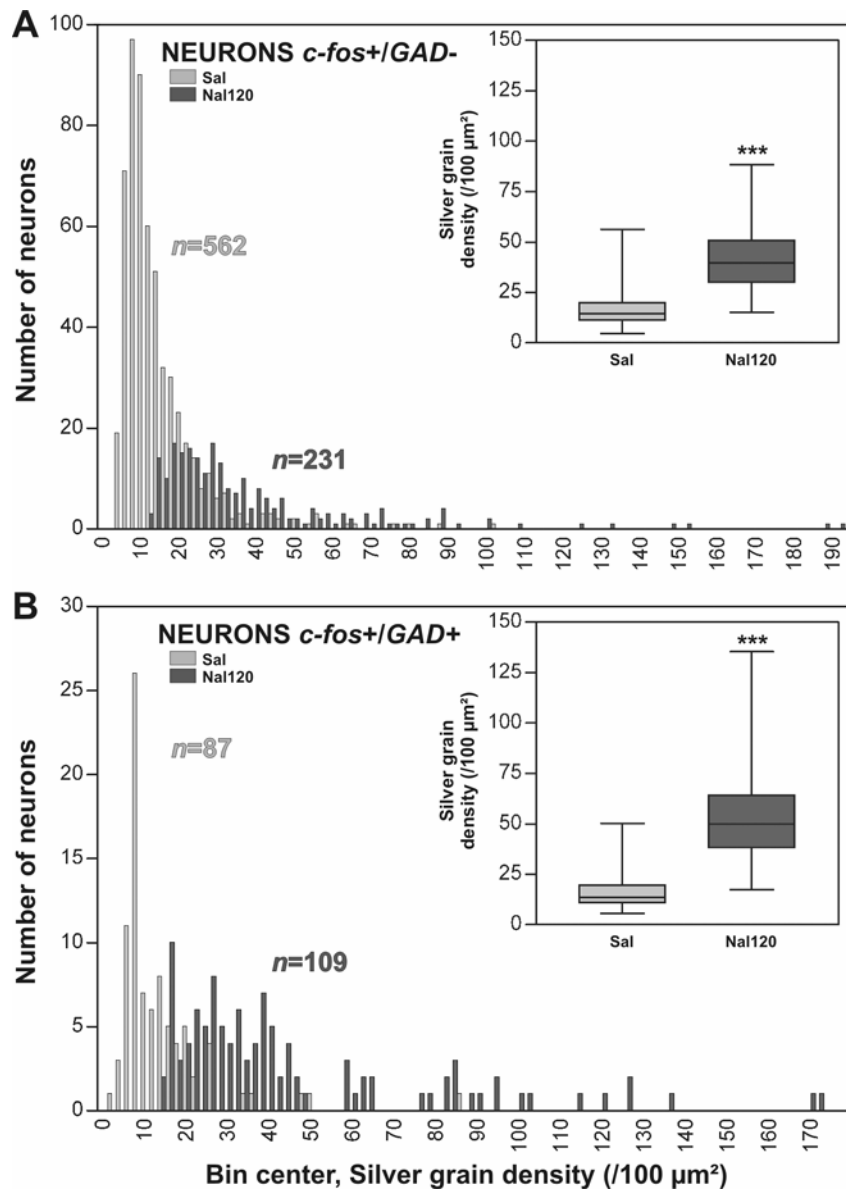


Figure 37. Distributions de fréquence de la densité de grain d'argent par unité de surface cellulaire exprimée dans les neurones *c-fos*+/GAD- et *c-fos*+/GAD+ du BIA, après un sevrage aigu précipité par 120 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de naloxone.

Encarts : « diagrammes en boîte » montrant les médianes (ligne du milieu de la boîte), les 25% et 75% percentiles (base et sommet de la boîte) et les valeurs minimales et maximales de la densité de grains d'argent pour les deux groupes (groupe Sal, boîte grise claire ; groupe Nal120, boîte grise foncée). Pour la population des neurones GAD négatifs (A), 562 neurones présentent un marquage *c-fos* en situation contrôle (groupe Sal, histogramme gris clair), alors que le nombre de neurones exprimant l'ARNm *c-fos* diminue fortement ($n = 231$) après un sevrage précipité par 120 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de naloxone (groupe Nal120, histogramme gris foncé). Cependant, la médiane de la densité de grains d'argent (encart en A) augmente après un sevrage aigu (groupe Nal120) pour atteindre 39.6 (25% et 75% percentile = 30.2 et 50.7 respectivement), par rapport à 14.6 (25% et 75% percentile = 11.4 et 19.9 respectivement) en situation contrôle (groupe Sal) (« *Mann Whitney test* » : $P < 0.0001$). Pour la population des neurones GAD positifs (B), le nombre de neurones marqués pour l'ARNm *c-fos* n'est pas modifié de manière significative après un sevrage précipité par la naloxone ($n = 109$, histogramme gris foncé), par rapport à la situation contrôle ($n = 87$, histogramme gris clair). Cependant, la médiane de la densité de grains d'argent (encart en B) augmente également après un sevrage aigu (groupe Nal120) pour atteindre 49.9 (25% et 75% percentile = 38.2 et 64.2 respectivement), par rapport à 13.6 (25% et 75% percentile = 10.8 et 19.6 respectivement) en situation contrôle (groupe Sal) (« *Mann Whitney test* » : $P < 0.0001$). Le test statistique de « *Kolmogorov-Smirnov* » montre des différences significatives entre les distributions de fréquence des animaux des groupes Sal et Nal120 pour les deux populations neuronales ($\chi^2 = 270.01$ pour *c-fos*+/GAD+, $\chi^2 = 97.764$ pour *c-fos*+/GAD- ; $P < 0.0001$ dans les deux cas).

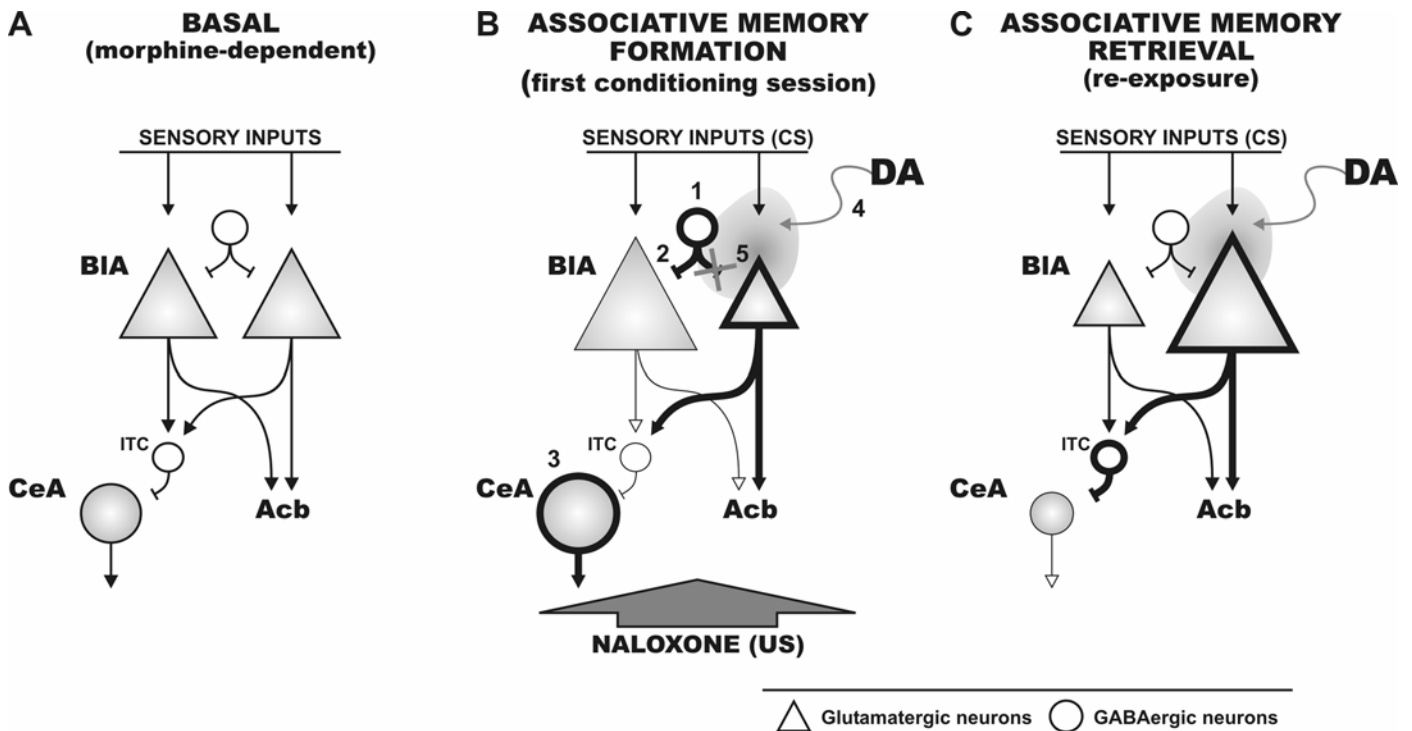


Figure 38. Modèle fonctionnel pour la formation et le rappel de la « mémoire du sevrage des opiacés ».

Basé sur notre analyse phénotypique, ce diagramme schématique représente les relations fonctionnelles entre les principaux noyaux de l'amygdale (BIA et CeA), en relation avec leurs connexions afférentes et efférentes, en condition basale (A, « *morphine-dependent* »), et pendant la formation d'associations Pavloviennes (B, « *first pairing between morphine withdrawal and environmental stimuli* ») ou le rappel de l'association mémorisée (C, « *re-exposure to withdrawal-paired stimuli* »). Les neurones efférents excitateurs du BIA sont représentés par des triangles, et les interneurons inhibiteurs du BIA sont représentés par des cercles. Les neurones du noyau intercalé de l'amygdale (ITC) correspondent à une interface inhibitrice située entre les neurones efférents glutamatergiques du BIA et les neurones GABAergiques du CeA. Les variations du nombre de neurones exprimant l'ARNm *c-fos* dans une population donnée après un sevrage aigu précipité par la naloxone (B) ou après réexposition aux stimuli associés précédemment au sevrage (C) (en comparaison avec la situation basale, A), sont représentées par l'augmentation ou la diminution de la taille des triangles et des cercles. L'épaisseur des lignes de connexion entre les neurones varie en fonction de l'activité neuronale supposée dans les différentes voies. La forme ovoïde grise autour de l'interaction synaptique entre les afférences sensorielles, les interneurons du BIA et les neurones efférents du BIA représente l'effet neuromodulateur de la dopamine sur les neurones glutamatergiques efférents du BIA au cours du conditionnement, comme proposé par Grace & Rosenkranz (2002). Pendant la première session de conditionnement [B, présentation contingente du syndrome de sevrage (naloxone, US) avec les stimuli environnementaux (CS)], les interneurons GABAergiques du BIA sont activés (1) et par conséquent inhibent certains neurones efférents du BIA (2). La diminution de l'activité de ces neurones efférents devrait résulter en une augmentation de l'activité des neurones du CeA (3) en diminuant l'inhibition de type « *feed-forward* » médiée par les neurones de l'ITC. En parallèle, la situation aversive associée au sevrage pourrait induire une libération de dopamine dans l'amygdale (4) qui devrait, dans ce cas, supprimer l'effet inhibiteur des interneurons du BIA sur une sous-population de neurones efférents du BIA (5), permettant ainsi un traitement par ces neurones efférents glutamatergiques des informations pertinentes en provenance des afférences sensorielles (stimuli environnementaux, CS). Au fur et à mesure des répétitions des sessions de conditionnement, ces processus cellulaires pourraient s'intensifier et recruter de plus en plus de neurones efférents du BIA, amenant le système dans un état très sensible au CS (entre B et C). Cette procédure de conditionnement pourrait permettre le transfert des propriétés aversives du sevrage (US) vers les stimuli environnementaux (CS). Lors de la réexposition à la situation environnementale conditionnée (C), le CS seul serait alors capable de retrouver l'association mémorisée (probablement via un effet neuromodulateur de la dopamine), en réactivant les neurones efférents du BIA facilités au cours du conditionnement. L'augmentation de l'activité d'un grand nombre de neurones glutamatergiques du BIA devrait résulter en une augmentation de l'inhibition de type « *feed-forward* » (médiée par les neurones de l'ITC) sur les neurones du CeA, et au changement de l'activité des structures de l'« *extended amygdala* » (qui incluent le CeA, le BNST et l'Acb). Acb, noyaux accumbens ; BIA, noyau basolatéral de l'amygdale ; CeA, noyau central de l'amygdale ; DA, dopamine ; ITC, neurones du noyau intercalé de l'amygdale (« *intercalated cell masses* »).

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

“Surtout évitez de fumer, ça c'est ce qu'il y a de pire, c'est sûr, et de conduire en état d'ivresse et puis essayez de faire de l'exercice. Et dites non à la drogue c'est une saloperie. Et laissez pas vos copains vous attacher sur des rails. C'est ça le plus important ; ne vous laissez surtout pas attacher sur des rails.”

Mark Renton, attaché aux rails...

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

I. CONCLUSIONS

La consommation chronique de substances opiacées entraîne le développement d'une dépendance ; état qui est sous-tendu par la mise en place de nombreuses neuroadaptations au sein du système nerveux central (pour revue : Koob & Le Moal, 2001). Chez l'individu dépendant, l'arrêt de l'usage de la drogue provoque l'apparition d'un syndrome de sevrage intense qui comporte deux composantes : ① une composante psychique (motivationnelle) qui apparaît très précocement, suivie par ② l'émergence de nombreux symptômes physiques (composante somatique). Il a été proposé que le désir d'éviter cet état affectif aversif pourrait contribuer à la nature compulsive de la consommation et de l'abus de substances opiacées (pour revue : Bechara *et al.*, 1998).

Dans les conduites addictives, le « *craving* », qui correspond au désir impérieux pour la drogue que ressentent les toxicomanes, serait à l'origine de la perte de contrôle sur la consommation de drogue, mais a également été isolé comme un facteur déterminant capable de précipiter la rechute, chez l'individu abstinant (pour revues : Robinson & Berridge, 2000; Koob & Le Moal, 2001). En effet, la présentation de stimuli conditionnés au sevrage des opiacés (« mémoire du sevrage ») chez un toxicomane est capable d'induire un état de « *craving* » intense (Wikler, 1973; Jaffe, 1990), ce qui suggère que les stimuli présents dans l'environnement de l'individu au cours du sevrage peuvent acquérir des propriétés motivationnelles propres, et ainsi déclencher le désir d'expérimenter à nouveau la drogue.

La part motivationnelle du syndrome de sevrage des opiacés et des stimuli environnementaux qui lui sont associés semble donc déterminante dans les comportements addictifs, et, par analogie à l'hypothèse proposée pour les effets appétitifs conditionnés des drogues (pour revues : Stewart *et al.*, 1984; Self & Nestler, 1998; Koob & Le Moal, 2001), les stimuli conditionnés au sevrage des opiacés pourraient être capables de réactiver les circuits neuronaux qui sont recrutés par le syndrome de sevrage lui-même, et ainsi activer des processus motivationnels poussant l'individu à consommer à nouveau la drogue. Dans ce contexte théorique, l'identification des substrats neurobiologiques qui sous-tendent les aspects motivationnels du sevrage des opiacés, ainsi que la compréhension des mécanismes cellulaires mis en jeu, apparaît comme une étape fondamentale et primordiale de la mise au point de stratégies thérapeutiques rationnelles et efficaces des conduites addictives, qui permettraient alors aux toxicomanes de ne plus ressentir ce désir irrésistible pour la drogue.



D'un point de vue comportemental, nous avons montré que la composante motivationnelle du sevrage des opiacés peut être modélisée chez le rat morphino-dépendant par l'administration de très faibles doses de naloxone, qui sont capables d'induire un état de malaise aversif (révélé dans le

modèle d'aversion de place conditionnée), qui est asymptotique. En revanche, l'administration de doses plus fortes de naloxone (> 20 µg/kg) provoque l'apparition de nombreux symptômes somatiques du sevrage. Ainsi, nous avons analysé les substrats neurobiologiques qui sont recrutés par l'injection de doses croissantes de naloxone, en utilisant l'hybridation *in situ* pour l'ARNm du proto-oncogène *c-fos* (marqueur de réactivité neuronale), afin de couvrir l'ensemble des caractéristiques du sevrage. De plus, nous avons comparé ces circuits neuronaux avec ceux qui sont recrutés lors de la présentation de stimuli environnementaux précédemment associés au sevrage de la morphine (dans un modèle d'aversion de place conditionnée), révélant ainsi la composante motivationnelle induite par des stimuli conditionnés au sevrage.

Nos résultats montrent que les substrats neuronaux sous-jacents à la composante motivationnelle du sevrage – qui incluent en particulier les structures de l'« *extended amygdala* » (noyau accumbens partie médiale shell, noyau du lit de la strie terminale et noyau central de l'amygdale) et les régions limbiques qui lui sont associées (noyau basolatéral de l'amygdale, hippocampe, septum latéral et aire tegmentale ventrale) – peuvent être dissociés d'un ensemble d'autres régions cérébrales qui sont en revanche impliquées dans l'expression de la symptomatologie somatique du sevrage. Le pattern d'expression de l'ARNm *c-fos* que nous détectons dans ces structures semble refléter ① la mise en place de processus d'apprentissage associatif permettant d'encoder la valeur affective des stimuli environnementaux associés au sevrage de la morphine, dans la situation inconditionnée (« *incentive-learning* ») et ② le rappel et l'expression des associations mémorisées au cours du conditionnement, dans la situation conditionnée (« mémoire du sevrage »).

La Figure 39 résume les résultats que nous avons obtenus et illustre de manière schématique les circuits neurobiologiques qui sont engagés dans le traitement des informations liées à la composante motivationnelle du sevrage (structures cérébrales colorées en bleu), ainsi que les réponses détectées dans les neurones phénotypiquement identifiés du noyau basolatéral de l'amygdale (BIA, encart de gauche) et de l'aire tegmentale ventrale (VTA, encart de droite). Sur la base de nos résultats et de nombreuses données de la littérature (pour revues : Self & Nestler, 1998; Berke & Hyman, 2000; Grace & Rosenkranz, 2002; Shalev *et al.*, 2002; Rosenkranz & Grace, 2003), nous proposons un modèle fonctionnel pour la formation et le rappel de la « mémoire du sevrage des opiacés ». Lors de la formation de la « mémoire du sevrage », des mécanismes de plasticité, modulés par la dopamine, dans les neurones glutamatergiques du BIA (voir Figure 38) pourraient permettre l'encodage des associations entre l'US (sevrage précipité par la naloxone) et le CS (stimuli environnementaux). Cette procédure de conditionnement permet le transfert de la signification « *incentive* » de l'état affectif négatif associé au sevrage des opiacés – information traitée par les régions limbiques de l'« *extended amygdala* » – vers des stimuli de l'environnement associés au sevrage des opiacés. Par la suite, lors du rappel des associations mémorisées, les stimuli environnementaux seraient capables de retrouver la valeur motivationnelle et « *incentive* » du sevrage qu'ils prédisent, en réactivant les neurones du BIA qui auraient été potentialisés au cours des sessions de conditionnement, et ceci, également par l'intermédiaire de mécanismes mettant en jeu la dopamine. Ces informations seraient alors utilisées pour le contrôle des réponses du CeA et des structures qui lui sont associées (BNST, hypothalamus, locus cœruleus, etc...), ce qui pourrait induire l'expression de réponses émotionnelles conditionnées

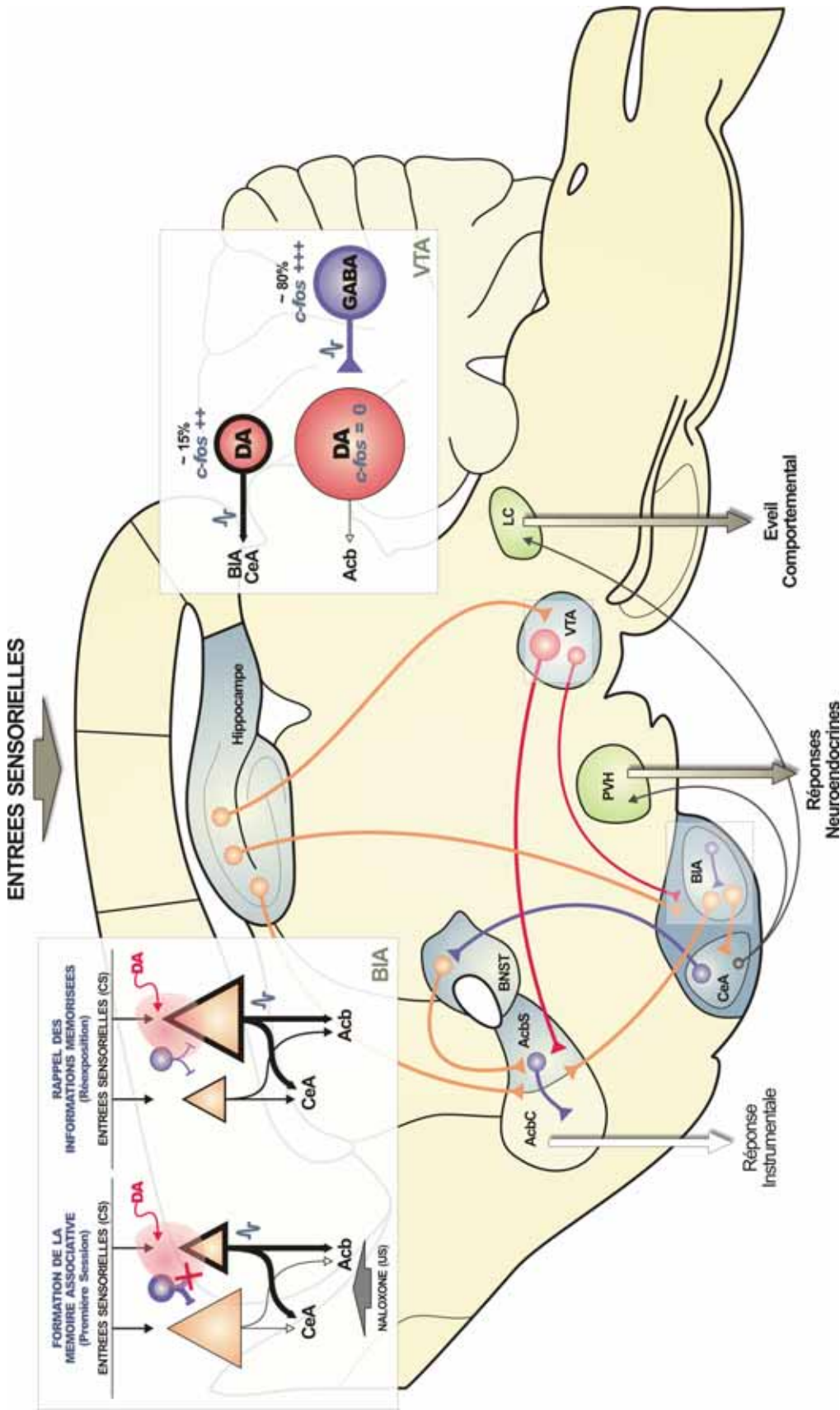


Figure 39 Vue d'ensemble des résultats : circuits neurobiologiques engagés dans le traitement des informations liées à la composante motivationnelle du sevrage.

Les structures colorées en bleu correspondent aux régions qui sont recrutées par la composante motivationnelle du sevrage des opiacés, qu'elle soit révélée par l'injection de faibles doses de naloxone (dans la situation inconditionnée), ou bien par la présentation de stimuli précédemment associés au sevrage des opiacés (dans la situation conditionnée). Les structures colorées en vert correspondent aux régions recrutées lors de l'expression de la composante somatique du sevrage de la morphine, mais également lors de la réponse conditionnée. Les voies de projections excitatrices glutamatergiques sont représentées en orange, les circuits inhibiteurs GABAergiques sont représentés en bleu, et les afférences dopaminergiques neuromodulatrices en provenance de la VTA sont représentées en rouge. Encart de gauche : réponses des neurones du BIA lors de la formation de la mémoire associative et du rappel des informations mémorisées (pour de plus amples précisions sur ces aspects, voir Figure 38). Encart de droite : réponses des neurones phénotypiquement identifiés de la VTA, qui sont identiques dans la situation inconditionnée et conditionnée. Dans les deux encarts, la taille des cercles et des triangles représentant le nombre relatif de neurones dans une population donnée, et l'épaisseur des lignes de connexion entre les neurones varie en fonction de l'activité neuronale supposée dans les différentes voies. Acb, noyau accumbens ; AcbS, noyau accumbens partie shell ; AcbC, noyau accumbens partie core ; BIA, noyau basolatéral de l'amygdale ; BNST, noyau du lit de la strie terminale ; CeA, noyau central de l'amygdale ; DA, dopamine ; PVH, noyau paraventriculaire de l'hypothalamus ; LC, locus coeruleus ; VTA, aire tegmentale ventrale.

(peur, anxiété), et permettre la modulation des processus attentionnels et de l'éveil comportemental. De plus, les projections directes du BIA vers le noyau accumbens pourraient moduler de manière directe les réponses des neurones de cette structure et/ou leur contrôle dopaminergique, afin de générer l'expression d'un comportement adapté en relation avec les propriétés motivationnelles des stimuli conditionnés.

En conclusion, il semble bien que la présentation de stimuli environnementaux précédemment associés au syndrome de sevrage de la morphine soit capable à elle seule de réactiver les substrats neurobiologiques qui sont recrutés de manière inconditionnée par la composante motivationnelle du sevrage, bien que les mécanismes cellulaires mis en jeu dans ces processus puissent être en partie différents (notamment au niveau du noyau basolatéral de l'amygdale). La réactivation de ces circuits neuronaux pourrait provoquer l'émergence d'un état affectif aversif, qui est supposé déterminant dans le maintien de la consommation compulsive de la drogue et/ou dans la rechute après abstinence, qui représentent deux des comportements essentiels caractérisant les conduites addictives (Bechara *et al.*, 1998; Siegel, 1999; Ahmed *et al.*, 2000; Grimm *et al.*, 2001; Hutcheson *et al.*, 2001; Harris & Aston-Jones, 2003).

Cependant, notre protocole expérimental ne nous permet pas de tester de manière directe la capacité de ces stimuli environnementaux conditionnés au sevrage à motiver un comportement de recherche de drogue. En effet, dans nos expériences pour les effets conditionnés du sevrage, nous avons utilisé une procédure de confinement pour la réexposition au CS, dans laquelle les animaux conditionnés sont dans l'incapacité d'engager une séquence comportementale adéquate, dans le but d'exercer un contrôle instrumental sur la situation dans laquelle ils se trouvent. Ceci pourrait en partie expliquer le fait que certaines structures cérébrales, telles que la partie core du noyau accumbens ou encore les aires corticales préfrontale et cingulaire, ne soient pas recrutées par la simple réexposition aux stimuli conditionnés. En effet, ces structures ont été impliquées dans les processus dénommés « *Pavlovian-to-instrumental transfer* » qui se réfèrent à la capacité de stimuli conditionnés de type Pavlovien à affecter une performance instrumentale (pour revue : Cardinal *et al.*, 2002). Dans notre situation expérimentale un tel « transfert » de l'association Pavlovienne vers une action instrumentale est impossible puisque les rats sont confinés, et notre procédure de confinement permet de ne tester que l'effet du rappel d'associations Pavloviennes.

A notre connaissance, l'effet des stimuli conditionnés au sevrage des opiacés sur la réinstallation du comportement de consommation de drogue n'a jusqu'à présent encore jamais été testé dans les modèles d'autoadministration intraveineuse de drogue, classiquement utilisés pour ce genre d'étude. Cependant, Shaham *et al.* (1996) ont analysé la capacité du syndrome de sevrage de la morphine à provoquer la rechute dans ce modèle, et ont montré qu'un sevrage précipité de manière aiguë par la naloxone (100 µg/kg) ne permet pas de déclencher un comportement de recherche de drogue, alors que des animaux expérimentant un sevrage spontané rechutent. Ces résultats montrent bien que la composante motivationnelle du sevrage qui s'exprime très précocement lors du sevrage spontané chez l'animal morphino-dépendant est capable de précipiter la rechute, exactement comme chez les toxicomanes en manque de drogue, qui n'attendent pas l'expression de la composante somatique du sevrage pour rechercher l'héroïne. En revanche, chez les animaux expérimentant un syndrome de

sevrage de la morphine précipité par une forte dose de naloxone – qui s’exprime donc par l’ensemble de la symptomatologie physique du sevrage – le comportement de recherche de drogue est absent. Ceci est probablement dû au fait que, dans ce cas, les rats sont dans un état de malaise aversif trop intense, ce qui les empêche physiquement de se comporter, et d’exprimer leur désir de consommer à nouveau la drogue pour apaiser cet état affectif négatif.

II. PERSPECTIVES

L’ensemble de ce travail nous a permis de « tracer » les circuits neurobiologiques impliqués dans la composante motivationnelle du sevrage des opiacés, et nous a amené à proposer un modèle fonctionnel pour la formation et le rappel de la « mémoire du sevrage ». Cependant, sur la base de nos résultats et du modèle que nous proposons, de nombreuses questions restent en suspens.

Nous proposons que le pattern d’expression de *c-fos* que nous détectons dans les structures limbiques qui sont impliquées dans la composante motivationnelle du sevrage reflète la mise en place de processus d’apprentissage associatif qui permettent d’encoder la valeur affective et motivationnelle des stimuli environnementaux associés au sevrage de la morphine. Notamment, nous supposons que des mécanismes de plasticité impliquant la dopamine dans le noyau basolatéral de l’amygdale (BIA) pourraient être à l’origine de ces phénomènes. De nombreuses expériences restent à réaliser pour vérifier cette hypothèse. Par exemple, notre modèle suppose qu’au cours des sessions répétées de conditionnement (qui impliquent que les animaux expérimentent plusieurs syndromes de sevrage), des mécanismes de facilitation pourraient se mettre en place, en particulier dans l’aire tegmentale ventrale (VTA) et le BIA. Il est donc fondamental d’étudier l’évolution de l’activité de ces structures au cours de la répétition des sessions de conditionnement (lors de sevrages répétés), en utilisant, dans un premier temps, la détection de l’expression de *c-fos* comme marqueur de réactivité neuronale, mais également en étudiant la régulation de l’expression d’autres marqueurs d’activité neuronale, comme par exemple les « *chronic Fras* », qui sont plutôt recrutés dans des situations chroniques ou semi-chroniques.

Par ailleurs, si ces phénomènes de plasticité sont modulés par la dopamine dans l’amygdale comme nous le proposons, il est primordial de rechercher si les neurones dopaminergiques de la VTA qui projettent vers le BIA, sont effectivement activés d’un point de vue électrophysiologique au cours du sevrage de la morphine précipité par la naloxone. Si tel est le cas, le rôle fonctionnel de la dopamine sur l’activité électrique des neurones du BIA pourrait par la suite être étudié par diverses approches (lésions à la 6-OHDA, pharmacologie dopaminergique locale, études de « *patch-clamp* » sur tranches d’amygdale, etc...). L’implication des noyaux de l’amygdale (basolatéral et central) dans les processus de conditionnement (apprentissage et rappel) devra également être étudiée au niveau comportemental, sur l’acquisition et l’expression de l’aversion de place conditionnée, en utilisant une stratégie d’inactivation locale et transitoire de ces structures par la lidocaïne.

Nos résultats anatomiques décrivent un circuit de structures cérébrales qui sont recrutées lors de la réexposition d'animaux conditionnés à un environnement précédemment associé au sevrage des opiacés. Parmi ces régions, certaines pourraient spécifiquement être impliquées dans la composante motivationnelle du sevrage (structures limbiques de l'« *extended amygdala* », BIA, hippocampe et VTA), alors que d'autres (comme le locus cœruleus et le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus) semblent plutôt directement engagées dans la réponse conditionnée des animaux. Dans cette étude, nous avons analysé les substrats neurobiologiques qui sous-tendent la « mémoire du sevrage de la morphine » à court terme, et ceci, chez des animaux étant toujours sous l'emprise de la morphine. Cependant, comme nous l'avons déjà mentionné, l'expression de l'aversion de place conditionnée induite par la naloxone chez des animaux morphino-dépendants est un comportement extrêmement tenace, qui peut s'exprimer jusqu'à plus d'un an chez des animaux abstinents. Ainsi, afin d'étudier la dynamique de ces processus de mémoire à plus long terme, il est essentiel de « tracer » l'expression de marqueurs de réactivité neuronale chez des rats abstinents, à différentes périodes suivant le conditionnement.

Enfin, notre protocole expérimental ne nous a pas permis de tester directement l'effet des stimuli conditionnés au sevrage sur la motivation des animaux à expérimenter à nouveau la drogue, ni même de mesurer la réponse émotionnelle des animaux lors de la réexposition aux stimuli conditionnés. Ainsi, il apparaît fondamental de développer un modèle animal de réinstallation du comportement de prise de drogue induit par les stimuli conditionnés au sevrage des opiacés, dans lequel ces différents paramètres comportementaux pourraient être évalués directement, en même temps que l'effet des stimuli associés au sevrage sur la réactivité neuronale.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Acquas E., Carboni E. & Di Chiara G. (1991) Profound depression of mesolimbic dopamine release after morphine withdrawal in dependent rats. *Eur J Pharmacol* **193**:133-134.
- Acquas E. & Di Chiara G. (1992) Depression of mesolimbic dopamine transmission and sensitization to morphine during opiate abstinence. *J Neurochem* **58**:1620-1625.
- Adolphs R., Tranel D. & Damasio A.R. (1998) The human amygdala in social judgment. *Nature* **393**:470-474.
- Adolphs R., Tranel D., Damasio H. & Damasio A. (1994) Impaired recognition of emotion in facial expressions following bilateral damage to the human amygdala. *Nature* **372**:669-672.
- Aggleton J.P. (1993) The contribution of the amygdala to normal and abnormal emotional states. *Trends Neurosci* **16**:328-333.
- Aggleton J.P. (2000) *The amygdala: a functional analysis*, Second Edition. New York: Oxford Univ Press.
- Aghajanian G.K. (1978) Tolerance of locus coeruleus neurons to morphine and suppression of withdrawal response by clonidine. *Nature* **276**:186-188.
- Ahmed S.H. & Koob G.F. (1998) Transition from moderate to excessive drug intake: change in hedonic set point. *Science* **282**:298-300.
- Ahmed S.H., Walker J.R. & Koob G.F. (2000) Persistent increase in the motivation to take heroin in rats with a history of drug escalation. *Neuropsychopharmacology* **22**:413-421.
- Akil H., Owens C., Gutstein H., Taylor L., Curran E. & Watson S. (1998) Endogenous opioids: overview and current issues. *Drug Alcohol Depend* **51**:127-140.
- Alexander G.E. & Crutcher M.D. (1990) Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci* **13**:266-271.
- Alheid G.F. (2003) Extended amygdala and basal forebrain. *Ann N Y Acad Sci* **985**:185-205.
- Alheid G.F., De Olmos J. & Beltramino C.A. (1995) Amygdala and extended amygdala. In: *The rat nervous system*, Second Edition (Paxinos G., ed), pp 495-578. London: Academic Press.
- Alheid G.F. & Heimer L. (1988) New perspectives in basal forebrain organization of special relevance for neuropsychiatric disorders: the striatopallidal, amygdaloid, and corticopetal components of substantia innominata. *Neuroscience* **27**:1-39.
- Alheid G.F. & Heimer L. (1996) Theories of basal forebrain organization and the "emotional motor system". *Prog Brain Res* **107**:461-484.
- Altman J., Everitt B.J., Glautier S., Markou A., Nutt D., Oretti R., Phillips G.D. & Robbins T.W. (1996) The biological, social and clinical bases of drug addiction: commentary and debate. *Psychopharmacology (Berl)* **125**:285-345.
- Amaral D.G., Price J.L., Pitkanen A. & Carmichael S.T. (1992) Anatomical organization of the primate amygdaloid complex. In: *The amygdala: neurobiological aspects of emotion, memory, and mental dysfunction* (Aggleton J.P., ed), pp 1-66. New York: Wiley-Liss.
- Anagnostaras S.G. & Robinson T.E. (1996) Sensitization to the psychomotor stimulant effects of amphetamine: modulation by associative learning. *Behav Neurosci* **110**:1397-1414.
- Asan E. (1997) Ultrastructural features of tyrosine-hydroxylase-immunoreactive afferents and their targets in the rat amygdala. *Cell Tissue Res* **288**:449-469.
- Aston-Jones G., Delfs J.M., Druhan J. & Zhu Y. (1999a) The bed nucleus of the stria terminalis. A target site for noradrenergic actions in opiate withdrawal. *Ann N Y Acad Sci* **877**:486-498.
- Aston-Jones G., Hirata H. & Akaoka H. (1997) Local opiate withdrawal in locus coeruleus in vivo. *Brain Res* **765**:331-336.
- Aston-Jones G., Rajkowski J. & Cohen J. (1999b) Role of locus coeruleus in attention and behavioral flexibility. *Biol Psychiatry* **46**:1309-1320.
- Avidor-Reiss T., Nevo I., Levy R., Pfeuffer T. & Vogel Z. (1996) Chronic opioid treatment induces adenylyl cyclase V superactivation. Involvement of Gbetagamma. *J Biol Chem* **271**:21309-21315.
- Baldwin H.A. & Koob G.F. (1993) Rapid induction of conditioned opiate withdrawal in the rat. *Neuropsychopharmacology* **8**:15-21.

- Bals-Kubik R., Ableitner A., Herz A. & Shippenberg T.S. (1993) Neuroanatomical sites mediating the motivational effects of opioids as mapped by the conditioned place preference paradigm in rats. *J Pharmacol Exp Ther* **264**:489-495.
- Bardo M.T. (1998) Neuropharmacological mechanisms of drug reward: beyond dopamine in the nucleus accumbens. *Crit Rev Neurobiol* **12**:37-67.
- Barrot M., Olivier J.D., Perrotti L.I., DiLeone R.J., Berton O., Eisch A.J., Impey S., Storm D.R., Neve R.L., Yin J.C., Zachariou V. & Nestler E.J. (2002) CREB activity in the nucleus accumbens shell controls gating of behavioral responses to emotional stimuli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:11435-11440.
- Bassareo V., Tanda G. & Di Chiara G. (1995) Increase of extracellular dopamine in the medial prefrontal cortex during spontaneous and naloxone-precipitated opiate abstinence. *Psychopharmacology (Berl)* **122**:202-205.
- Bayer V.E. & Pickel V.M. (1991) GABA-labeled terminals form proportionally more synapses with dopaminergic neurons containing low densities of tyrosine hydroxylase-immunoreactivity in rat ventral tegmental area. *Brain Res* **559**:44-55.
- Bechara A., Harrington F., Nader K. & van der Kooy D. (1992) Neurobiology of motivation: double dissociation of two motivational mechanisms mediating opiate reward in drug-naive versus drug-dependent animals. *Behav Neurosci* **106**:798-807.
- Bechara A., Nader K. & van der Kooy D. (1998) A two-separate-motivational-systems hypothesis of opioid addiction. *Pharmacol Biochem Behav* **59**:1-17.
- Bechara A., Tranel D., Damasio H., Adolphs R., Rockland C. & Damasio A.R. (1995) Double dissociation of conditioning and declarative knowledge relative to the amygdala and hippocampus in humans. *Science* **269**:1115-1118.
- Becker A., Grecksch G., Brodemann R., Kraus J., Peters B., Schroeder H., Thiemann W., Loh H.H. & Holtt V. (2000) Morphine self-administration in mu-opioid receptor-deficient mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **361**:584-589.
- Beckmann A.M., Matsumoto I. & Wilce P.A. (1995) Immediate early gene expression during morphine withdrawal. *Neuropharmacology* **34**:1183-1189.
- Beitner-Johnson D. & Nestler E.J. (1991) Morphine and cocaine exert common chronic actions on tyrosine hydroxylase in dopaminergic brain reward regions. *J Neurochem* **57**:344-347.
- Beitner-Johnson D. & Nestler E.J. (1993) Chronic morphine impairs axoplasmic transport in the rat mesolimbic dopamine system. *Neuroreport* **5**:57-60.
- Benoit-Marand M., Jaber M. & Gonon F. (2000) Release and elimination of dopamine in vivo in mice lacking the dopamine transporter: functional consequences. *Eur J Neurosci* **12**:2985-2992.
- Berke J.D. & Hyman S.E. (2000) Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. *Neuron* **25**:515-532.
- Berrendero F., Castane A., Ledent C., Parmentier M., Maldonado R. & Valverde O. (2003) Increase of morphine withdrawal in mice lacking A2a receptors and no changes in CB1/A2a double knockout mice. *Eur J Neurosci* **17**:315-324.
- Berridge K.C. & Robinson T.E. (1998) What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Res Rev* **28**:309-369.
- Besson C. & Louilot A. (1995) Asymmetrical involvement of mesolimbic dopaminergic neurons in affective perception. *Neuroscience* **68**:963-968.
- Bhargava H.N. & Gulati A. (1990) Down-regulation of brain and spinal cord mu-opiate receptors in morphine tolerant-dependent rats. *Eur J Pharmacol* **190**:305-311.
- Bindra D. (1978) How adaptive behavior is produced: a perceptual-motivation alternative to response reinforcement. *Behav Brain Sci* **1**:41-91.
- Bissiere S., Humeau Y. & Luthi A. (2003) Dopamine gates LTP induction in lateral amygdala by suppressing feedforward inhibition. *Nat Neurosci* **6**:587-592.
- Björklund A., Hökfeldt T. & Kuhar M.J. (1984) Classical transmitters and transmitter receptors in the CNS. In: *Handbook of chemical neuroanatomy* (Björklund A., Hökfeldt T., Kuhar M.J., eds): Elsevier.
- Björklund A. & Lindvall O. (1984) Dopamine-containing systems in the CNS. In: *Handbook of chemical neuroanatomy. Classical neurotransmitters in the CNS* (Björklund A., Hökfeldt T., eds), pp 55-121.
- Björklund A. & Lindvall O. (1986) Catecholaminergic brain stem regulatory systems. In: *Handbook of physiology. The nervous system. IV. Intrinsic regulatory systems of the brain* (Mountcastle V.B., Bloom F.E., R. G.S., eds), pp 677-700.

- Blake A.D., Bot G., Li S., Freeman J.C. & Reisine T. (1997) Differential agonist regulation of the human kappa-opioid receptor. *J Neurochem* **68**:1846-1852.
- Blanchard D.C. & Blanchard R.J. (1972) Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. *J Comp Physiol Psychol* **81**:281-290.
- Bonci A. & Williams J.T. (1996) A common mechanism mediates long-term changes in synaptic transmission after chronic cocaine and morphine. *Neuron* **16**:631-639.
- Bonci A. & Williams J.T. (1997) Increased probability of GABA release during withdrawal from morphine. *J Neurosci* **17**:796-803.
- Bourinet E., Soong T.W., Stea A. & Snutch T.P. (1996) Determinants of the G protein-dependent opioid modulation of neuronal calcium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:1486-1491.
- Bozarth M.A. & Wise R.A. (1984) Anatomically distinct opiate receptor fields mediate reward and physical dependence. *Science* **224**:516-517.
- Brady L.S., Herkenham M., Long J.B. & Rothman R.B. (1989) Chronic morphine increases mu-opiate receptor binding in rat brain: a quantitative autoradiographic study. *Brain Res* **477**:382-386.
- Brinley-Reed M. & McDonald A.J. (1999) Evidence that dopaminergic axons provide a dense innervation of specific neuronal subpopulations in the rat basolateral amygdala. *Brain Res* **850**:127-135.
- Brodie M.E., Laverty R. & McQueen E.G. (1980) Noradrenaline release from slices of the thalamus of normal and morphine-dependent rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **313**:135-138.
- Brown E.E., Robertson G.S. & Fibiger H.C. (1992) Evidence for conditional neuronal activation following exposure to a cocaine-paired environment: role of forebrain limbic structures. *J Neurosci* **12**:4112-4121.
- Brownstein M.J. (1993) A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:5391-5393.
- Buccafusco J.J., Marshall D.C. & Turner R.M. (1984) A comparison of the inhibitory effects of clonidine and guanfacine on the behavioral and autonomic components of morphine withdrawal in rats. *Life Sci* **35**:1401-1408.
- Buzas B., Rosenberger J. & Cox B.M. (1996) Mu and delta opioid receptor gene expression after chronic treatment with opioid agonist. *Neuroreport* **7**:1505-1508.
- Cador M., Bijiou Y. & Stinus L. (1995) Evidence of a complete independence of the neurobiological substrates for the induction and expression of behavioral sensitization to amphetamine. *Neuroscience* **65**:385-395.
- Cador M., Robbins T.W., Everitt B.J., Simon H., Le Moal M. & Stinus L. (1991a) Limbic-striatal interactions in reward-related processes: modulation by the dopaminergic system. In: *The mesolimbic dopamine system: from motivation to action* (Willner P., Scheel-Krüger J., eds), pp 225-250. Chichester (UK): John Wiley & Sons Ltd.
- Cador M., Taylor J.R. & Robbins T.W. (1991b) Potentiation of the effects of reward-related stimuli by dopaminergic-dependent mechanisms in the nucleus accumbens. *Psychopharmacology (Berl)* **104**:377-385.
- Cahill L. (2000) Modulation of long-term memory storage in humans by emotional arousal: adrenergic activation and the amygdala. In: *The amygdala: a functional analysis*, Second Edition (Aggleton J.P., ed), pp 425-445. New York: Oxford Univ Press.
- Caillé S., Espejo E.F., Koob G.F. & Stinus L. (2002) Dorsal and median raphe serotonergic system lesion does not alter the opiate withdrawal syndrome. *Pharmacol Biochem Behav* **72**:979-986.
- Caillé S., Espejo E.F., Reneric J.P., Cador M., Koob G.F. & Stinus L. (1999) Total neurochemical lesion of noradrenergic neurons of the locus coeruleus does not alter either naloxone-precipitated or spontaneous opiate withdrawal nor does it influence ability of clonidine to reverse opiate withdrawal. *J Pharmacol Exp Ther* **290**:881-892.
- Caillé S., Stinus L., Espejo E.F., De Deurwaerdere P., Spampinato U. & Koob G.F. (2003) Inhibition of 5-HT neurotransmission increases clonidine protective effects on naloxone-induced conditioned place aversion in morphine-dependent rats. *Neuropsychopharmacology* **28**:276-283.
- Cardinal R.N., Parkinson J.A., Hall J. & Everitt B.J. (2002) Emotion and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex. *Neurosci Biobehav Rev* **26**:321-352.
- Carlezon W.A., Jr., Thome J., Olson V.G., Lane-Ladd S.B., Brodtkin E.S., Hiroi N., Duman R.S., Neve R.L. & Nestler E.J. (1998) Regulation of cocaine reward by CREB. *Science* **282**:2272-2275.
- Carr K.D., Kutchukhidze N. & Park T.H. (1999) Differential effects of mu and kappa opioid antagonists on Fos-like immunoreactivity in extended amygdala. *Brain Res* **822**:34-42.

- Cassell M.D., Freedman L.J. & Shi C. (1999) The intrinsic organization of the central extended amygdala. *Ann N Y Acad Sci* **877**:217-241.
- Castelli M.P., Melis M., Mameli M., Fadda P., Diaz G. & Gessa G.L. (1997) Chronic morphine and naltrexone fail to modify mu-opioid receptor mRNA levels in the rat brain. *Mol Brain Res* **45**:149-153.
- Chakrabarti S., Law P.Y. & Loh H.H. (1995) Neuroblastoma Neuro2A cells stably expressing a cloned mu-opioid receptor: a specific cellular model to study acute and chronic effects of morphine. *Mol Brain Res* **30**:269-278.
- Childress A.R., Hole A.V., Ehrman R.N., Robbins S.J., McLellan A.T. & O'Brien C.P. (1993) Cue reactivity and cue reactivity interventions in drug dependence. *NIDA Res Monogr* **137**:73-95.
- Ciccocioppo R., Sanna P.P. & Weiss F. (2001) Cocaine-predictive stimulus induces drug-seeking behavior and neural activation in limbic brain regions after multiple months of abstinence: reversal by D(1) antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:1976-1981.
- Coco M.L., Kuhn C.M., Ely T.D. & Kilts C.D. (1992) Selective activation of mesoamygdaloid dopamine neurons by conditioned stress: attenuation by diazepam. *Brain Res* **590**:39-47.
- Cole R.L., Konradi C., Douglass J. & Hyman S.E. (1995) Neuronal adaptation to amphetamine and dopamine: molecular mechanisms of prodynorphin gene regulation in rat striatum. *Neuron* **14**:813-823.
- Cornish J.L., Duffy P. & Kalivas P.W. (1999) A role for nucleus accumbens glutamate transmission in the relapse to cocaine-seeking behavior. *Neuroscience* **93**:1359-1367.
- Cornish J.L. & Kalivas P.W. (2000) Glutamate transmission in the nucleus accumbens mediates relapse in cocaine addiction. *J Neurosci* **20**:RC89.
- Cornish J.L. & Kalivas P.W. (2001) Cocaine sensitization and craving: differing roles for dopamine and glutamate in the nucleus accumbens. *J Addict Dis* **20**:43-54.
- Corrigall W.A. & Vaccarino F.J. (1988) Antagonist treatment in nucleus accumbens or periaqueductal grey affects heroin self-administration. *Pharmacol Biochem Behav* **30**:443-450.
- Crippens D. & Robinson T.E. (1994) Withdrawal from morphine or amphetamine: different effects on dopamine in the ventral-medial striatum studied with microdialysis. *Brain Res* **650**:56-62.
- Curran T., Gordon M.B., Rubino K.L. & Sambucetti L.C. (1987) Isolation and characterization of the c-fos(rat) cDNA and analysis of post-translational modification in vitro. *Oncogene* **2**:79-84.
- Daunais J.B. & McGinty J.F. (1995) Cocaine binges differentially alter striatal prodynorphin and zif/268 mRNAs. *Mol Brain Res* **29**:201-210.
- David V. & Cazala P. (1994) A comparative study of self-administration of morphine into the amygdala and the ventral tegmental area in mice. *Behav Brain Res* **65**:205-211.
- Davis M., Rainnie D. & Cassell M. (1994) Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety. *Trends Neurosci* **17**:208-214.
- Davis M. & Shi C. (1999) The extended amygdala: are the central nucleus of the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis differentially involved in fear versus anxiety? *Ann N Y Acad Sci* **877**:281-291.
- Dayas C.V., Buller K.M., Crane J.W., Xu Y. & Day T.A. (2001) Stressor categorization: acute physical and psychological stressors elicit distinctive recruitment patterns in the amygdala and in medullary noradrenergic cell groups. *Eur J Neurosci* **14**:1143-1152.
- De Olmos J., Alheid G.F. & Beltramino C.A. (1985) Amygdala. In: *The rat nervous system* (Aggleton J.P., ed), pp 223-334. Sydney: Academic Press.
- De Vries T.J., Schoffelmeer A.N., Binnekade R., Mulder A.H. & Vanderschuren L.J. (1998) Drug-induced reinstatement of heroin- and cocaine-seeking behaviour following long-term extinction is associated with expression of behavioural sensitization. *Eur J Neurosci* **10**:3565-3571.
- De Vries T.J., Schoffelmeer A.N., Binnekade R. & Vanderschuren L.J. (1999) Dopaminergic mechanisms mediating the incentive to seek cocaine and heroin following long-term withdrawal of IV drug self-administration. *Psychopharmacology (Berl)* **143**:254-260.
- De Vries T.J. & Shippenberg T.S. (2002) Neural systems underlying opiate addiction. *J Neurosci* **22**:3321-3325.
- Delfs J.M., Zhu Y., Druhan J.P. & Aston-Jones G. (2000) Noradrenaline in the ventral forebrain is critical for opiate withdrawal-induced aversion. *Nature* **403**:430-434.
- Delfs J.M., Zhu Y., Druhan J.P. & Aston-Jones G.S. (1998) Origin of noradrenergic afferents to the shell subregion of the nucleus accumbens: anterograde and retrograde tract-tracing studies in the rat. *Brain Res* **806**:127-140.

- Dellu F., Piazza P.V., Mayo W., Le Moal M. & Simon H. (1996) Novelty-seeking in rats--biobehavioral characteristics and possible relationship with the sensation-seeking trait in man. *Neuropsychobiology* **34**:136-145.
- Deroche V., Le Moal M. & Piazza P.V. (1999) Cocaine self-administration increases the incentive motivational properties of the drug in rats. *Eur J Neurosci* **11**:2731-2736.
- Desmedt A., Garcia R. & Jaffard R. (1999) Vasopressin in the lateral septum promotes elemental conditioning to the detriment of contextual fear conditioning in mice. *Eur J Neurosci* **11**:3913-3921.
- Devine D.P., Leone P., Pocock D. & Wise R.A. (1993) Differential involvement of ventral tegmental mu, delta and kappa opioid receptors in modulation of basal mesolimbic dopamine release: in vivo microdialysis studies. *J Pharmacol Exp Ther* **266**:1236-1246.
- Devine D.P. & Wise R.A. (1994) Self-administration of morphine, DAMGO, and DPDPE into the ventral tegmental area of rats. *J Neurosci* **14**:1978-1984.
- Devoto P., Flore G., Pira L., Diana M. & Gessa L. (2002) Co-release of noradrenaline and dopamine in the prefrontal cortex after acute morphine and during morphine withdrawal. *Psychopharmacology (Berl)* **160**:220-224.
- Dhawan B.N., Cesselin F., Raghurir R., Reisine T., Bradley P.B., Portoghese P.S. & Hamon M. (1996) International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. *Pharmacol Rev* **48**:567-592.
- Di Chiara G. (1999) Drug addiction as dopamine-dependent associative learning disorder. *Eur J Pharmacol* **375**:13-30.
- Di Chiara G. & Imperato A. (1988) Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:5274-5278.
- Di Chiara G. & North R.A. (1992) Neurobiology of opiate abuse. *Trends Pharmacol Sci* **13**:185-193.
- Di Chiara G., Tanda G., Bassareo V., Pontieri F., Acquas E., Fenu S., Cadoni C. & Carboni E. (1999) Drug addiction as a disorder of associative learning. Role of nucleus accumbens shell/extended amygdala dopamine. *Ann N Y Acad Sci* **877**:461-485.
- Di Ciano P., Blaha C.D. & Phillips A.G. (1998) Conditioned changes in dopamine oxidation currents in the nucleus accumbens of rats by stimuli paired with self-administration or yoked-administration of d-amphetamine. *Eur J Neurosci* **10**:1121-1127.
- Diana M., Muntoni A.L., Pistis M., Melis M. & Gessa G.L. (1999) Lasting reduction in mesolimbic dopamine neuronal activity after morphine withdrawal. *Eur J Neurosci* **11**:1037-1041.
- Diana M., Pistis M., Muntoni A. & Gessa G. (1995) Profound decrease of mesolimbic dopaminergic neuronal activity in morphine withdrawn rats. *J Pharmacol Exp Ther* **272**:781-785.
- Dockstader C.L., Rubinstein M., Grandy D.K., Low M.J. & Van Der Kooy D. (2001) The D2 receptor is critical in mediating opiate motivation only in opiate-dependent and withdrawn mice. *Eur J Neurosci* **13**:995-1001.
- Done C., Silverstone P. & Sharp T. (1992) Effect of naloxone-precipitated morphine withdrawal on noradrenaline release in rat hippocampus in vivo. *Eur J Pharmacol* **215**:333-336.
- Druhan J.P., Walters C.L. & Aston-Jones G. (2000) Behavioral activation induced by D(2)-like receptor stimulation during opiate withdrawal. *J Pharmacol Exp Ther* **294**:531-538.
- Duggan A.W. & North R.A. (1983) Electrophysiology of opioids. *Pharmacol Rev* **35**:219-281.
- Duman R.S., Tallman J.F. & Nestler E.J. (1988) Acute and chronic opiate-regulation of adenylate cyclase in brain: specific effects in locus coeruleus. *J Pharmacol Exp Ther* **246**:1033-1039.
- Dworkin S.I., Guerin G.F., Co C., Goeders N.E. & Smith J.E. (1988) Lack of an effect of 6-hydroxydopamine lesions of the nucleus accumbens on intravenous morphine self-administration. *Pharmacol Biochem Behav* **30**:1051-1057.
- Eckhardt K., Nevo I., Levy R., Mikus G., Eichelbaum M. & Vogel Z. (2000) Morphine-related metabolites differentially activate adenylyl cyclase isozymes after acute and chronic administration. *FEBS Lett* **470**:309-314.
- Eisinger D.A., Ammer H. & Schulz R. (2002) Chronic morphine treatment inhibits opioid receptor desensitization and internalization. *J Neurosci* **22**:10192-10200.
- Espejo E.F., Cador M. & Stinus L. (1995) Ethopharmacological analysis of naloxone-precipitated morphine withdrawal syndrome in rats: a newly-developed "etho-score". *Psychopharmacology (Berl)* **122**:122-130.
- Ettenberg A., Pettit H.O., Bloom F.E. & Koob G.F. (1982) Heroin and cocaine intravenous self-administration in rats: mediation by separate neural systems. *Psychopharmacology (Berl)* **78**:204-209.

- Evans C.J., Keith D.E., Jr., Morrison H., Magendzo K. & Edwards R.H. (1992) Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science* **258**:1952-1955.
- Everitt B.J., Cardinal R.N., Hall J., Parkinson J.A. & Robbins T.W. (2000) Differential involvement of amygdala subsystems in appetitive conditioning and drug addiction. In: *The amygdala: a functional analysis*, Second Edition (Aggleton J.P., ed), pp 353-390. New York: Oxford Univ Press.
- Everitt B.J., Cardinal R.N., Parkinson J.A. & Robbins T.W. (2003) Appetitive behavior: impact of amygdala-dependent mechanisms of emotional learning. *Ann N Y Acad Sci* **985**:233-250.
- Everitt B.J., Dickinson A. & Robbins T.W. (2001) The neuropsychological basis of addictive behaviour. *Brain Res Rev* **36**:129-138.
- Everitt B.J., Morris K.A., O'Brien A. & Robbins T.W. (1991) The basolateral amygdala-ventral striatal system and conditioned place preference: further evidence of limbic-striatal interactions underlying reward-related processes. *Neuroscience* **42**:1-18.
- Everitt B.J., Parkinson J.A., Olmstead M.C., Arroyo M., Robledo P. & Robbins T.W. (1999) Associative processes in addiction and reward. The role of amygdala-ventral striatal subsystems. *Ann N Y Acad Sci* **877**:412-438.
- Everitt B.J. & Wolf M.E. (2002) Psychomotor stimulant addiction: a neural systems perspective. *J Neurosci* **22**:3312-3320.
- Fallon J.H., Koziell D.A. & Moore R.Y. (1978) Catecholamine innervation of the basal forebrain. II. Amygdala, suprarhinal cortex and entorhinal cortex. *J Comp Neurol* **180**:509-532.
- Fallon J.H. & Moore R.Y. (1978) Catecholamine innervation of the basal forebrain. IV. Topography of the dopamine projection to the basal forebrain and neostriatum. *J Comp Neurol* **180**:545-580.
- Fendt M. & Fanselow M.S. (1999) The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neurosci Biobehav Rev* **23**:743-760.
- Filliol D., Ghozland S., Chluba J., Martin M., Matthes H.W., Simonin F., Befort K., Gaveriaux-Ruff C., Dierich A., LeMeur M., Valverde O., Maldonado R. & Kieffer B.L. (2000) Mice deficient for delta- and mu-opioid receptors exhibit opposing alterations of emotional responses. *Nat Genet* **25**:195-200.
- Finn A.K. & Whistler J.L. (2001) Endocytosis of the mu opioid receptor reduces tolerance and a cellular hallmark of opiate withdrawal. *Neuron* **32**:829-839.
- Fontana D.J., Post R.M. & Pert A. (1993) Conditioned increases in mesolimbic dopamine overflow by stimuli associated with cocaine. *Brain Res* **629**:31-39.
- Franklin T.R. & Druhan J.P. (2000) Expression of Fos-related antigens in the nucleus accumbens and associated regions following exposure to a cocaine-paired environment. *Eur J Neurosci* **12**:2097-2106.
- Freedman L.J. & Cassell M.D. (1994) Distribution of dopaminergic fibers in the central division of the extended amygdala of the rat. *Brain Res* **633**:243-252.
- Frenois F., Cador M., Caillé S., Stinus L. & Le Moine C. (2002) Neural correlates of the motivational and somatic components of naloxone-precipitated morphine withdrawal. *Eur J Neurosci* **16**:1377-1389.
- Gabriel M., Burhans L. & Kashef A. (2003) Consideration of a unified model of amygdalar associative functions. *Ann N Y Acad Sci* **985**:206-217.
- Gallagher M., Graham P.W. & Holland P.C. (1990) The amygdala central nucleus and appetitive Pavlovian conditioning: lesions impair one class of conditioned behavior. *J Neurosci* **10**:1906-1911.
- Gallagher M. & Holland P.C. (1994) The amygdala complex: multiple roles in associative learning and attention. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:11771-11776.
- Gaveriaux-Ruff C. & Kieffer B.L. (2002) Opioid receptor genes inactivated in mice: the highlights. *Neuropeptides* **36**:62-71.
- Gellert V.F. & Holtzman S.G. (1978) Development and maintenance of morphine tolerance and dependence in the rat by scheduled access to morphine drinking solutions. *J Pharmacol Exp Ther* **205**:536-546.
- Georges F. & Aston-Jones G. (2001) Potent regulation of midbrain dopamine neurons by the bed nucleus of the stria terminalis. *J Neurosci* **21**:RC160.
- Georges F. & Aston-Jones G. (2002) Activation of ventral tegmental area cells by the bed nucleus of the stria terminalis: a novel excitatory amino acid input to midbrain dopamine neurons. *J Neurosci* **22**:5173-5187.
- Georges F. & Aston-Jones G. (2003) Prolonged activation of mesolimbic dopaminergic neurons by morphine withdrawal following clonidine: participation of imidazoline and norepinephrine receptors. *Neuropsychopharmacology* **28**:1140-1149.

- Georges F., Normand E., Bloch B. & Le Moine C. (1998) Opioid receptor gene expression in the rat brain during ontogeny, with special reference to the mesostriatal system: an in situ hybridization study. *Dev Brain Res* **109**:187-199.
- Georges F., Stinus L., Bloch B. & Le Moine C. (1999) Chronic morphine exposure and spontaneous withdrawal are associated with modifications of dopamine receptor and neuropeptide gene expression in the rat striatum. *Eur J Neurosci* **11**:481-490.
- Georges F., Stinus L. & Le Moine C. (2000) Mapping of c-fos gene expression in the brain during morphine dependence and precipitated withdrawal, and phenotypic identification of the striatal neurons involved. *Eur J Neurosci* **12**:4475-4486.
- Gerfen C.R. (1992) The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization. *Trends Neurosci* **15**:133-139.
- Gerrits M.A., Ramsey N.F., Wolterink G. & van Ree J.M. (1994) Lack of evidence for an involvement of nucleus accumbens dopamine D1 receptors in the initiation of heroin self-administration in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* **114**:486-494.
- Gerrits M.A. & Van Ree J.M. (1996) Effect of nucleus accumbens dopamine depletion on motivational aspects involved in initiation of cocaine and heroin self-administration in rats. *Brain Res* **713**:114-124.
- Gestreau C., Le Guen S. & Besson J.M. (2000) Is there tonic activity in the endogenous opioid systems? A c-Fos study in the rat central nervous system after intravenous injection of naloxone or naloxone-methiodide. *J Comp Neurol* **427**:285-301.
- Gewirtz J.C. & Davis M. (1998) Application of Pavlovian higher-order conditioning to the analysis of the neural substrates of fear conditioning. *Neuropharmacology* **37**:453-459.
- Ghozland S., Matthes H.W., Simonin F., Filliol D., Kieffer B.L. & Maldonado R. (2002) Motivational effects of cannabinoids are mediated by mu-opioid and kappa-opioid receptors. *J Neurosci* **22**:1146-1154.
- Giros B., Jaber M., Jones S.R., Wightman R.M. & Caron M.G. (1996) Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature* **379**:606-612.
- Gold L.H., Stinus L., Inturrisi C.E. & Koob G.F. (1994) Prolonged tolerance, dependence and abstinence following subcutaneous morphine pellet implantation in the rat. *Eur J Pharmacol* **253**:45-51.
- Gold M.S., Pottash A.C., Sweeney D.R. & Kleber H.D. (1980) Opiate withdrawal using clonidine. A safe, effective, and rapid nonopiate treatment. *Jama* **243**:343-346.
- Gold M.S., Redmond D.E., Jr. & Kleber H.D. (1978a) Clonidine blocks acute opiate-withdrawal symptoms. *Lancet* **2**:599-602.
- Gold M.S., Redmond D.E., Jr. & Kleber H.D. (1978b) Clonidine in opiate withdrawal. *Lancet* **1**:929-930.
- Gonon F., Burie J.B., Jaber M., Benoit-Marand M., Dumartin B. & Bloch B. (2000) Geometry and kinetics of dopaminergic transmission in the rat striatum and in mice lacking the dopamine transporter. *Prog Brain Res* **125**:291-302.
- Goodman A. (1990) Addiction: definition and implications. *Br J Addict* **85**:1403-1408.
- Grace A.A. & Rosenkranz J.A. (2002) Regulation of conditioned responses of basolateral amygdala neurons. *Physiol Behav* **77**:489-493.
- Gracy K.N., Dankiewicz L.A. & Koob G.F. (2001) Opiate withdrawal-induced fos immunoreactivity in the rat extended amygdala parallels the development of conditioned place aversion. *Neuropsychopharmacology* **24**:152-160.
- Grasing K., Bills D., Ghosh S., Schlussman S.D., Patel A.H. & Woodward J.J. (1997) Opiate modulation of striatal dopamine and hippocampal norepinephrine release following morphine withdrawal. *Neurochem Res* **22**:239-248.
- Grimm J.W., Hope B.T., Wise R.A. & Shaham Y. (2001) Incubation of cocaine craving after withdrawal. *Nature* **412**:141-142.
- Grimm J.W. & See R.E. (2000) Dissociation of primary and secondary reward-relevant limbic nuclei in an animal model of relapse. *Neuropsychopharmacology* **22**:473-479.
- Guarraci F.A., Frohardt R.J., Falls W.A. & Kapp B.S. (2000) The effects of intra-amygdaloid infusions of a D2 dopamine receptor antagonist on Pavlovian fear conditioning. *Behav Neurosci* **114**:647-651.
- Guarraci F.A., Frohardt R.J. & Kapp B.S. (1999a) Amygdaloid D1 dopamine receptor involvement in Pavlovian fear conditioning. *Brain Res* **827**:28-40.
- Guarraci F.A., Frohardt R.J., Young S.L. & Kapp B.S. (1999b) A functional role for dopamine transmission in the amygdala during conditioned fear. *Ann N Y Acad Sci* **877**:732-736.

- Guitart X., Thompson M.A., Mirante C.K., Greenberg M.E. & Nestler E.J. (1992) Regulation of cyclic AMP response element-binding protein (CREB) phosphorylation by acute and chronic morphine in the rat locus coeruleus. *J Neurochem* **58**:1168-1171.
- Haberstock-Debic H., Wein M., Barrot M., Colago E.E., Rahman Z., Neve R.L., Pickel V.M., Nestler E.J., von Zastrow M. & Svingos A.L. (2003) Morphine acutely regulates opioid receptor trafficking selectively in dendrites of nucleus accumbens neurons. *J Neurosci* **23**:4324-4332.
- Hall F.S., Sora I. & Uhl G.R. (2001a) Ethanol consumption and reward are decreased in mu-opiate receptor knockout mice. *Psychopharmacology (Berl)* **154**:43-49.
- Hall J., Thomas K.L. & Everitt B.J. (2000) Rapid and selective induction of BDNF expression in the hippocampus during contextual learning. *Nat Neurosci* **3**:533-535.
- Hall J., Thomas K.L. & Everitt B.J. (2001b) Cellular imaging of zif268 expression in the hippocampus and amygdala during contextual and cued fear memory retrieval: selective activation of hippocampal CA1 neurons during the recall of contextual memories. *J Neurosci* **21**:2186-2193.
- Hall J., Thomas K.L. & Everitt B.J. (2001c) Fear memory retrieval induces CREB phosphorylation and Fos expression within the amygdala. *Eur J Neurosci* **13**:1453-1458.
- Hamlin A., Buller K.M., Day T.A. & Osborne P.B. (2001) Peripheral withdrawal recruits distinct central nuclei in morphine-dependent rats. *Neuropharmacology* **41**:574-581.
- Han J.S., Holland P.C. & Gallagher M. (1999) Disconnection of the amygdala central nucleus and substantia innominata/nucleus basalis disrupts increments in conditioned stimulus processing in rats. *Behav Neurosci* **113**:143-151.
- Han J.S., McMahan R.W., Holland P. & Gallagher M. (1997) The role of an amygdalo-nigrostriatal pathway in associative learning. *J Neurosci* **17**:3913-3919.
- Hand T.H., Koob G.F., Stinus L. & Le Moal M. (1988) Aversive properties of opiate receptor blockade: evidence for exclusively central mediation in naive and morphine-dependent rats. *Brain Res* **474**:364-368.
- Harlan R.E. & Garcia M.M. (1998) Drugs of abuse and immediate-early genes in the forebrain. *Mol Neurobiol* **16**:221-267.
- Harris G.C. & Aston-Jones G. (1993) Beta-adrenergic antagonists attenuate somatic and aversive signs of opiate withdrawal. *Neuropsychopharmacology* **9**:303-311.
- Harris G.C. & Aston-Jones G. (1994) Involvement of D2 dopamine receptors in the nucleus accumbens in the opiate withdrawal syndrome. *Nature* **371**:155-157.
- Harris G.C. & Aston-Jones G. (2003) Enhanced morphine preference following prolonged abstinence: association with increased fos expression in the extended amygdala. *Neuropsychopharmacology* **28**:292-299.
- Hatfield T., Han J.S., Conley M., Gallagher M. & Holland P. (1996) Neurotoxic lesions of basolateral, but not central, amygdala interfere with Pavlovian second-order conditioning and reinforcer devaluation effects. *J Neurosci* **16**:5256-5265.
- He L., Fong J., von Zastrow M. & Whistler J.L. (2002) Regulation of opioid receptor trafficking and morphine tolerance by receptor oligomerization. *Cell* **108**:271-282.
- Heimer L., Alheid G.F., De Olmos J.S., Groenewegen H.J., Haber S.N., Harlan R.E. & Zahm D.S. (1997a) The accumbens: beyond the core-shell dichotomy. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* **9**:354-381.
- Heimer L., Harlan R.E., Alheid G.F., Garcia M.M. & De Olmos J. (1997b) Substantia innominata: a notion which impedes clinical-anatomical correlations in neuropsychiatric disorders. *Neuroscience* **76**:957-1006.
- Heinrichs S., Menzaghi F., Schulteis G., Koob G.F. & Stinus L. (1995) Suppression of corticotropin-releasing factor in the amygdala attenuates aversive consequences of morphine withdrawal. *Behav Pharmacol* **6**:74-80.
- Herdegen T. & Leah J.D. (1998) Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Res Rev* **28**:370-490.
- Herz A. (1997) Endogenous opioid systems and alcohol addiction. *Psychopharmacology (Berl)* **129**:99-111.
- Higgins G.A. & Sellers E.M. (1994) Antagonist-precipitated opioid withdrawal in rats: evidence for dissociations between physical and motivational signs. *Pharmacol Biochem Behav* **48**:1-8.
- Hitchcott P.K. & Phillips G.D. (1998) Double dissociation of the behavioural effects of R(+) 7-OH-DPAT infusions in the central and basolateral amygdala nuclei upon Pavlovian and instrumental conditioned appetitive behaviours. *Psychopharmacology (Berl)* **140**:458-469.

- Holland P.C., Han J.S. & Gallagher M. (2000) Lesions of the amygdala central nucleus alter performance on a selective attention task. *J Neurosci* **20**:6701-6706.
- Hollt V. (1986) Opioid peptide processing and receptor selectivity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **26**:59-77.
- Hotsenpiller G., Giorgetti M. & Wolf M.E. (2001) Alterations in behaviour and glutamate transmission following presentation of stimuli previously associated with cocaine exposure. *Eur J Neurosci* **14**:1843-1855.
- Hughes J., Smith T., Morgan B. & Fothergill L. (1975) Purification and properties of enkephalin - the possible endogenous ligand for the morphine receptor. *Life Sci* **16**:1753-1758.
- Hughes P. & Dragunow M. (1995) Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system. *Pharmacol Rev* **47**:133-178.
- Hutcheson D.M., Everitt B.J., Robbins T.W. & Dickinson A. (2001) The role of withdrawal in heroin addiction: enhances reward or promotes avoidance? *Nat Neurosci* **4**:943-947.
- Ingram S.L., Vaughan C.W., Bagley E.E., Connor M. & Christie M.J. (1998) Enhanced opioid efficacy in opioid dependence is caused by an altered signal transduction pathway. *J Neurosci* **18**:10269-10276.
- Ito R., Dalley J.W., Howes S.R., Robbins T.W. & Everitt B.J. (2000) Dissociation in conditioned dopamine release in the nucleus accumbens core and shell in response to cocaine cues and during cocaine-seeking behavior in rats. *J Neurosci* **20**:7489-7495.
- Jaffe J.H. (1990) *Drug addiction and drug abuse*. New York: Pergamon press.
- Javelle N., Renaud B. & Lambas-Senas L. (1997) Monoamine metabolism in the locus coeruleus measured concurrently with behavior during opiate withdrawal: an in vivo microdialysis study in freely moving rats. *J Neurochem* **68**:683-690.
- Johnson D.W. & Glick S.D. (1993) Dopamine release and metabolism in nucleus accumbens and striatum of morphine-tolerant and nontolerant rats. *Pharmacol Biochem Behav* **46**:341-347.
- Jolas T. & Aghajanian G.K. (1997) Opioids suppress spontaneous and NMDA-induced inhibitory postsynaptic currents in the dorsal raphe nucleus of the rat in vitro. *Brain Res* **755**:229-245.
- Jolas T., Nestler E.J. & Aghajanian G.K. (2000) Chronic morphine increases GABA tone on serotonergic neurons of the dorsal raphe nucleus: association with an up-regulation of the cyclic AMP pathway. *Neuroscience* **95**:433-443.
- Julien J.F., Legay F., Dumas S., Tappaz M. & Mallet J. (1987) Molecular cloning, expression and in situ hybridization of rat brain glutamic acid decarboxylase messenger RNA. *Neurosci Lett* **73**:173-180.
- Kalivas P.W. (1993) Neurotransmitter regulation of dopamine neurons in the ventral tegmental area. *Brain Res Rev* **18**:75-113.
- Kalivas P.W., Pierce R.C., Cornish J. & Sorg B.A. (1998) A role for sensitization in craving and relapse in cocaine addiction. *J Psychopharmacol* **12**:49-53.
- Kalivas P.W. & 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.
- Keith D.E., Anton B., Murray S.R., Zaki P.A., Chu P.C., Lissin D.V., Monteillet-Agius G., Stewart P.L., Evans C.J. & von Zastrow M. (1998) mu-Opioid receptor internalization: opiate drugs have differential effects on a conserved endocytic mechanism in vitro and in the mammalian brain. *Mol Pharmacol* **53**:377-384.
- Kelley A.E., Domesick V.B. & Nauta W.J. (1982) The amygdalostratial projection in the rat: an anatomical study by anterograde and retrograde tracing methods. *Neuroscience* **7**:615-630.
- Kelsey J.E., Carlezon W.A., Jr. & Falls W.A. (1989) Lesions of the nucleus accumbens in rats reduce opiate reward but do not alter context-specific opiate tolerance. *Behav Neurosci* **103**:1327-1334.
- Kelz M.B., Chen J., Carlezon W.A., Jr., Whisler K., Gilden L., Beckmann A.M., Steffen C., Zhang Y.J., Marotti L., Self D.W., Tkatch T., Baranaukas G., Surmeier D.J., Neve R.L., Duman R.S., Picciotto M.R. & Nestler E.J. (1999) Expression of the transcription factor deltaFosB in the brain controls sensitivity to cocaine. *Nature* **401**:272-276.
- Kelz M.B. & Nestler E.J. (2000) deltaFosB: a molecular switch underlying long-term neural plasticity. *Curr Opin Neurol* **13**:715-720.
- Kieffer B.L. (1995) Recent advances in molecular recognition and signal transduction of active peptides: receptors for opioid peptides. *Cell Mol Neurobiol* **15**:615-635.
- Kieffer B.L. (1999) Opioids: first lessons from knockout mice. *Trends Pharmacol Sci* **20**:19-26.
- Kieffer B.L., Befort K., Gaveriaux-Ruff C. & Hirth C.G. (1992) The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:12048-12052.

- Killcross S., Robbins T.W. & Everitt B.J. (1997) Different types of fear-conditioned behaviour mediated by separate nuclei within amygdala. *Nature* **388**:377-380.
- Kimes A.S., Bell J.A. & London E.D. (1990) Clonidine attenuates increased brain glucose metabolism during naloxone-precipitated morphine withdrawal. *Neuroscience* **34**:633-644.
- Koob G.F. (1992) Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends Pharmacol Sci* **13**:177-184.
- Koob G.F. (1996) Drug addiction: the yin and yang of hedonic homeostasis. *Neuron* **16**:893-896.
- Koob G.F. (1999) Corticotropin-releasing factor, norepinephrine, and stress. *Biol Psychiatry* **46**:1167-1180.
- Koob G.F. & Bloom F.E. (1988) Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. *Science* **242**:715-723.
- Koob G.F., Caine S.B., Parsons L., Markou A. & Weiss F. (1997) Opponent process model and psychostimulant addiction. *Pharmacol Biochem Behav* **57**:513-521.
- Koob G.F. & Le Moal M. (1997) Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science* **278**:52-58.
- Koob G.F. & Le Moal M. (2001) Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology* **24**:97-129.
- Koob G.F., Maldonado R. & Stinus L. (1992) Neural substrates of opiate withdrawal. *Trends Neurosci* **15**:186-191.
- Koob G.F., Stinus L., Le Moal M. & Bloom F.E. (1989) Opponent process theory of motivation: neurobiological evidence from studies of opiate dependence. *Neurosci Biobehav Rev* **13**:135-140.
- Kosaka T., Kosaka K., Hataguchi Y., Nagatsu I., Wu J.Y., Ottersen O.P., Storm-Mathisen J. & Hama K. (1987) Catecholaminergic neurons containing GABA-like and/or glutamic acid decarboxylase-like immunoreactivities in various brain regions of the rat. *Exp Brain Res* **66**:191-210.
- Kovacs K.J. (1998) c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. *Neurochem Int* **33**:287-297.
- La Bar K.S., Le Doux J.E., Spencer D.D. & Phelps E.A. (1995) Impaired fear conditioning following unilateral temporal lobectomy in humans. *J Neurosci* **15**:6846-6855.
- Lane-Ladd S.B., Pineda J., Boundy V.A., Pfeuffer T., Krupinski J., Aghajanian G.K. & Nestler E.J. (1997) CREB (cAMP response element-binding protein) in the locus coeruleus: biochemical, physiological, and behavioral evidence for a role in opiate dependence. *J Neurosci* **17**:7890-7901.
- Law P.Y., Hom D.S. & Loh H.H. (1982) Loss of opiate receptor activity in neuroblastoma X glioma NG108-15 hybrid cells after chronic opiate treatment. A multiple-step process. *Mol Pharmacol* **22**:1-4.
- Law P.Y. & Loh H.H. (1999) Regulation of opioid receptor activities. *J Pharmacol Exp Ther* **289**:607-624.
- Le Doux J.E. (2000) Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* **23**:155-184.
- Le Guen S., Gestreau C. & Besson J.M. (2001) Sensitivity to naloxone of the behavioral signs of morphine withdrawal and c-Fos expression in the rat CNS: A quantitative dose-response analysis. *J Comp Neurol* **433**:272-296.
- Le Moine C. (2000) Quantitative in situ hybridization using radioactive probes to study gene expression in heterocellular systems. *Methods Mol Biol* **123**:143-156.
- 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., Kieffer B., Gaveriaux-Ruff C., Befort K. & Bloch B. (1994) Delta-opioid receptor gene expression in the mouse forebrain: localization in cholinergic neurons of the striatum. *Neuroscience* **62**:635-640.
- Loh H.H. & Smith A.P. (1990) Molecular characterization of opioid receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **30**:123-147.
- Lord J.A., Waterfield A.A., Hughes J. & Kosterlitz H.W. (1977) Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature* **267**:495-499.
- Louilot A. & Besson C. (2000) Specificity of amygdalostratial interactions in the involvement of mesencephalic dopaminergic neurons in affective perception. *Neuroscience* **96**:73-82.
- Louilot A., Simon H., Taghzouti K. & Le Moal M. (1985) Modulation of dopaminergic activity in the nucleus accumbens following facilitation or blockade of the dopaminergic transmission in the amygdala: a study by in vivo differential pulse voltammetry. *Brain Res* **346**:141-145.
- Maldonado R. (1997) Participation of noradrenergic pathways in the expression of opiate withdrawal: biochemical and pharmacological evidence. *Neurosci Biobehav Rev* **21**:91-104.

- Maldonado R., Blendy J.A., Tzavara E., Gass P., Roques B.P., Hanoune J. & Schutz G. (1996) Reduction of morphine abstinence in mice with a mutation in the gene encoding CREB. *Science* **273**:657-659.
- Maldonado R., Saiardi A., Valverde O., Samad T.A., Roques B.P. & Borrelli E. (1997) Absence of opiate rewarding effects in mice lacking dopamine D2 receptors. *Nature* **388**:586-589.
- Maldonado R., Stinus L., Gold L.H. & Koob G.F. (1992) Role of different brain structures in the expression of the physical morphine withdrawal syndrome. *J Pharmacol Exp Ther* **261**:669-677.
- Malin D.H., Hempel A.G., Exley R.J. & Addington S. (1986) Clonidine reverses the behavioral and respiratory effects of continuous naloxone infusion. *Pharmacol Biochem Behav* **25**:989-993.
- Malkova L., Gaffan D. & Murray E.A. (1997) Excitotoxic lesions of the amygdala fail to produce impairment in visual learning for auditory secondary reinforcement but interfere with reinforcer devaluation effects in rhesus monkeys. *J Neurosci* **17**:6011-6020.
- Mansour A., Fox C.A., Akil H. & Watson S.J. (1995a) Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends Neurosci* **18**:22-29.
- Mansour A., Fox C.A., Burke S., Akil H. & Watson S.J. (1995b) Immunohistochemical localization of the cloned mu opioid receptor in the rat CNS. *J Chem Neuroanat* **8**:283-305.
- Mansour A., Fox C.A., Meng F., Akil H. & Watson S.J. (1994) Kappa 1 receptor mRNA distribution in the rat CNS: comparison to kappa receptor binding and prodynorphin mRNA. *Mol Cell Neurosci* **5**:124-144.
- Maren S. (1999) Long-term potentiation in the amygdala: a mechanism for emotional learning and memory. *Trends Neurosci* **22**:561-567.
- Maren S. (2001) Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Annu Rev Neurosci* **24**:897-931.
- Maren S. (2003) The amygdala, synaptic plasticity, and fear memory. *Ann N Y Acad Sci* **985**:106-113.
- Mark G.P., Blander D.S. & Hoebel B.G. (1991) A conditioned stimulus decreases extracellular dopamine in the nucleus accumbens after the development of a learned taste aversion. *Brain Res* **551**:308-310.
- Martin M., Ledent C., Parmentier M., Maldonado R. & Valverde O. (2000) Cocaine, but not morphine, induces conditioned place preference and sensitization to locomotor responses in CB1 knockout mice. *Eur J Neurosci* **12**:4038-4046.
- Martin W.R., Eades C.G., Thompson J.A., Huppler R.E. & Gilbert P.E. (1976) The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J Pharmacol Exp Ther* **197**:517-532.
- Matthes H.W., Maldonado R., Simonin F., Valverde O., Slowe S., Kitchen I., Befort K., Dierich A., Le Meur M., Dolle P., Tzavara E., Hanoune J., Roques B.P. & Kieffer B.L. (1996) Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature* **383**:819-823.
- McDonald A.J. (1985a) Immunohistochemical identification of gamma-aminobutyric acid-containing neurons in the rat basolateral amygdala. *Neurosci Lett* **53**:203-207.
- McDonald A.J. (1985b) Morphology of peptide-containing neurons in the rat basolateral amygdaloid nucleus. *Brain Res* **338**:186-191.
- McDonald A.J. (1989) Coexistence of somatostatin with neuropeptide Y, but not with cholecystokinin or vasoactive intestinal peptide, in neurons of the rat amygdala. *Brain Res* **500**:37-45.
- McDonald A.J. (1991) Topographical organization of amygdaloid projections to the caudatoputamen, nucleus accumbens, and related striatal-like areas of the rat brain. *Neuroscience* **44**:15-33.
- McDonald A.J. (1992) Projection neurons of the basolateral amygdala: a correlative Golgi and retrograde tract tracing study. *Brain Res Bull* **28**:179-185.
- McDonald A.J. (1996) Glutamate and aspartate immunoreactive neurons of the rat basolateral amygdala: colocalization of excitatory amino acids and projections to the limbic circuit. *J Comp Neurol* **365**:367-379.
- McDonald A.J. & Betette R.L. (2001) Parvalbumin-containing neurons in the rat basolateral amygdala: morphology and co-localization of Calbindin-D(28k). *Neuroscience* **102**:413-425.
- McDonald A.J., Shammah-Lagnado S.J., Shi C. & Davis M. (1999) Cortical afferents to the extended amygdala. *Ann N Y Acad Sci* **877**:309-338.
- Meil W.M. & See R.E. (1997) Lesions of the basolateral amygdala abolish the ability of drug associated cues to reinstate responding during withdrawal from self-administered cocaine. *Behav Brain Res* **87**:139-148.
- Millhouse O.E. (1986) The intercalated cells of the amygdala. *J Comp Neurol* **247**:246-271.
- Minami M. & Satoh M. (1995) Molecular biology of the opioid receptors: structures, functions and distributions. *Neurosci Res* **23**:121-145.

- Mogenson G.J., Jones D.L. & Yim C.Y. (1980) From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. *Prog Neurobiol* **14**:69-97.
- Montminy M.R., Gonzalez G.A. & Yamamoto K.K. (1990) Regulation of cAMP-inducible genes by CREB. *Trends Neurosci* **13**:184-188.
- Morgan J.I. & Curran T. (1995) Immediate-early genes: ten years on. *Trends Neurosci* **18**:66-67.
- Mucha R.F. (1987) Is the motivational effect of opiate withdrawal reflected by common somatic indices of precipitated withdrawal? A place conditioning study in the rat. *Brain Res* **418**:214-220.
- Mulder A.H. & Schoffeleers A.N. (1993) Multiple opioid receptors and presynaptic modulation of neurotransmitter release in the brain. In: *Handbook of experimental pharmacology* (Herz A., ed), pp 125-144. Berlin: Springer-Verlag.
- Nader K., Bechara A. & van der Kooy D. (1997) Neurobiological constraints on behavioral models of motivation. *Annu Rev Psychol* **48**:85-114.
- Nader K. & Le Doux J.E. (1997) Is it time to invoke multiple fear learning systems in the amygdala? *Trends Cogn Sci* **1**:241-244.
- Nader K. & Le Doux J.E. (1999) Inhibition of the mesoamygdala dopaminergic pathway impairs the retrieval of conditioned fear associations. *Behav Neurosci* **113**:891-901.
- Nader K. & van der Kooy D. (1997) Deprivation state switches the neurobiological substrates mediating opiate reward in the ventral tegmental area. *J Neurosci* **17**:383-390.
- Neisewander J.L., Baker D.A., Fuchs R.A., Tran-Nguyen L.T., Palmer A. & Marshall J.F. (2000) Fos protein expression and cocaine-seeking behavior in rats after exposure to a cocaine self-administration environment. *J Neurosci* **20**:798-805.
- Nestler E.J. (1996) Under siege: The brain on opiates. *Neuron* **16**:897-900.
- Nestler E.J. (1997) Molecular mechanisms of opiate and cocaine addiction. *Curr Opin Neurobiol* **7**:713-719.
- Nestler E.J. (2001) Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat Rev Neurosci* **2**:119-128.
- Nestler E.J. & Aghajanian G.K. (1997) Molecular and cellular basis of addiction. *Science* **278**:58-63.
- Nestler E.J., Barrot M. & Self D.W. (2001) Delta FosB: A sustained molecular switch for addiction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:11042-11046.
- Nestler E.J., Erdos J.J., Terwilliger R., Duman R.S. & Tallman J.F. (1989) Regulation of G proteins by chronic morphine in the rat locus coeruleus. *Brain Res* **476**:230-239.
- Nestler E.J., Hope B.T. & Widnell K.L. (1993) Drug addiction: a model for the molecular basis of neural plasticity. *Neuron* **11**:995-1006.
- Nestler E.J., Kelz M.B. & Chen J. (1999) DeltaFosB: a molecular mediator of long-term neural and behavioral plasticity. *Brain Res* **835**:10-17.
- Nitecka L. & Ben-Ari Y. (1987) Distribution of GABA-like immunoreactivity in the rat amygdaloid complex. *J Comp Neurol* **266**:45-55.
- North R.A. (1986) Opioid receptor types and membrane ion channels. *Trends in Neurosciences* **9**:114-117.
- O'Brien C.P., Childress A.R., McLellan A.T. & Ehrman R.N. (1992) A learned model of addiction. In: *Addictive states* (O'Brien C.P., Jaffe J.H., eds), pp 157-178. New York: Raven Press.
- Pak Y., O'Dowd B.F. & George S.R. (1997) Agonist-induced desensitization of the mu opioid receptor is determined by threonine 394 preceded by acidic amino acids in the COOH-terminal tail. *J Biol Chem* **272**:24961-24965.
- Pare D., Royer S., Smith Y. & Lang E.J. (2003) Contextual inhibitory gating of impulse traffic in the intra-amygdaloid network. *Ann N Y Acad Sci* **985**:78-91.
- Parkinson J.A., Olmstead M.C., Burns L.H., Robbins T.W. & Everitt B.J. (1999) Dissociation in effects of lesions of the nucleus accumbens core and shell on appetitive pavlovian approach behavior and the potentiation of conditioned reinforcement and locomotor activity by D-amphetamine. *J Neurosci* **19**:2401-2411.
- Parkinson J.A., Robbins T.W. & Everitt B.J. (2000) Dissociable roles of the central and basolateral amygdala in appetitive emotional learning. *Eur J Neurosci* **12**:405-413.
- Paxinos G. & Watson C. (1997) *The rat brain in stereotaxic coordinates*, Compact Third Edition. San Diego: Academic Press.

- Pei G., Kieffer B.L., Lefkowitz R.J. & Freedman N.J. (1995) Agonist-dependent phosphorylation of the mouse delta-opioid receptor: involvement of G protein-coupled receptor kinases but not protein kinase C. *Mol Pharmacol* **48**:173-177.
- Pennypacker K.R., Hong J.S. & McMillian M.K. (1995) Implications of prolonged expression of Fos-related antigens. *Trends Pharmacol Sci* **16**:317-321.
- Pert A., Post R. & Weiss S.R. (1990) Conditioning as a critical determinant of sensitization induced by psychomotor stimulants. *NIDA Res Monogr* **97**:208-241.
- Pert C.B., Pasternak G. & Snyder S.H. (1973) Opiate agonists and antagonists discriminated by receptor binding in brain. *Science* **182**:1359-1361.
- Pettit H.O., Ettenberg A., Bloom F.E. & Koob G.F. (1984) Destruction of dopamine in the nucleus accumbens selectively attenuates cocaine but not heroin self-administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)* **84**:167-173.
- Pezzone M.A., Lee W.S., Hoffman G.E. & Rabin B.S. (1992) Induction of c-Fos immunoreactivity in the rat forebrain by conditioned and unconditioned aversive stimuli. *Brain Res* **597**:41-50.
- Phelix C.F., Liposits Z. & Paull W.K. (1992) Monoamine innervation of bed nucleus of stria terminalis: an electron microscopic investigation. *Brain Res Bull* **28**:949-965.
- Phillips A.G. & LePiane F.G. (1980) Reinforcing effects of morphine microinjection into the ventral tegmental area. *Pharmacol Biochem Behav* **12**:965-968.
- Piazza P.V., Deminiere J.M., Le Moal M. & Simon H. (1989) Factors that predict individual vulnerability to amphetamine self-administration. *Science* **245**:1511-1513.
- Piazza P.V., Deroche V., Deminiere J.M., Maccari S., Le Moal M. & Simon H. (1993) Corticosterone in the range of stress-induced levels possesses reinforcing properties: implications for sensation-seeking behaviors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:11738-11742.
- Piazza P.V. & Le Moal M. (1998) The role of stress in drug self-administration. *Trends Pharmacol Sci* **19**:67-74.
- Piazza P.V., Maccari S., Deminiere J.M., Le Moal M., Mormede P. & Simon H. (1991a) Corticosterone levels determine individual vulnerability to amphetamine self-administration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:2088-2092.
- Piazza P.V., Rouge-Pont F., Deminiere J.M., Kharoubi M., Le Moal M. & Simon H. (1991b) Dopaminergic activity is reduced in the prefrontal cortex and increased in the nucleus accumbens of rats predisposed to develop amphetamine self-administration. *Brain Res* **567**:169-174.
- Pitkanen A. (2000) Connectivity of the rat amygdaloid complex. In: *The amygdala: a functional analysis*, Second Edition (Aggleton J.P., ed), pp 31-115. New York: Oxford Univ Press.
- Pitkanen A., Savander M., Nurminen N. & Ylinen A. (2003) Intrinsic synaptic circuitry of the amygdala. *Ann N Y Acad Sci* **985**:34-49.
- Pitkanen A., Savander V. & Le Doux J.E. (1997) Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends Neurosci* **20**:517-523.
- Pothos E., Rada P., Mark G.P. & Hoebel B.G. (1991) Dopamine microdialysis in the nucleus accumbens during acute and chronic morphine, naloxone-precipitated withdrawal and clonidine treatment. *Brain Res* **566**:348-350.
- Price J.L., Russchen F.T. & Amaral D.G. (1987) The limbic region. II. The amygdaloid complex. In: *Handbook of chemical neuroanatomy. Integrated systems of the CNS* (Björklund A., Hökfeldt T., Swanson D.J., eds), pp 279-388. Amsterdam: Elsevier.
- Puttfarcken P.S., Werling L.L. & Cox B.M. (1988) Effects of chronic morphine exposure on opioid inhibition of adenylyl cyclase in 7315c cell membranes: a useful model for the study of tolerance at mu opioid receptors. *Mol Pharmacol* **33**:520-527.
- Rasmussen K., Beitner-Johnson D.B., Krystal J.H., Aghajanian G.K. & Nestler E.J. (1990) Opiate withdrawal and the rat locus coeruleus: behavioral, electrophysiological, and biochemical correlates. *J Neurosci* **10**:2308-2317.
- Rasmussen K., Brodsky M. & Inturrisi C.E. (1995) NMDA antagonists and clonidine block c-fos expression during morphine withdrawal. *Synapse* **20**:68-74.
- Roberts A.J., Gold L.H., Polis I., McDonald J.S., Filliol D., Kieffer B.L. & Koob G.F. (2001) Increased ethanol self-administration in delta-opioid receptor knockout mice. *Alcohol Clin Exp Res* **25**:1249-1256.
- Robins L.N. (1993) The sixth Thomas James Okey Memorial Lecture. Vietnam veterans' rapid recovery from heroin addiction: a fluke or normal expectation? *Addiction* **88**:1041-1054.

- Robinson T.E. & Berridge K.C. (1993) The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Rev* **18**:247-291.
- Robinson T.E. & Berridge K.C. (2000) The psychology and neurobiology of addiction: an incentive-sensitization view. *Addiction* **95 Suppl 2**:S91-117.
- Robinson T.E. & Kolb B. (1997) Persistent structural modifications in nucleus accumbens and prefrontal cortex neurons produced by previous experience with amphetamine. *J Neurosci* **17**:8491-8497.
- Robinson T.E. & Kolb B. (1999a) 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 T.E. & Kolb B. (1999b) Morphine alters the structure of neurons in the nucleus accumbens and neocortex of rats. *Synapse* **33**:160-162.
- Robledo P., Robbins T.W. & Everitt B.J. (1996) Effects of excitotoxic lesions of the central amygdaloid nucleus on the potentiation of reward-related stimuli by intra-accumbens amphetamine. *Behav Neurosci* **110**:981-990.
- Rodriguez de Fonseca F. & Navarro M. (1998) Role of the limbic system in dependence on drugs. *Ann Med* **30**:397-405.
- Rolls E.T. (2000) Precis of The brain and emotion. *Behav Brain Sci* **23**:177-191; discussion 192-233.
- Rosenkranz J.A. & Grace A.A. (1999) Modulation of basolateral amygdala neuronal firing and afferent drive by dopamine receptor activation in vivo. *J Neurosci* **19**:11027-11039.
- Rosenkranz J.A. & Grace A.A. (2001) Dopamine attenuates prefrontal cortical suppression of sensory inputs to the basolateral amygdala of rats. *J Neurosci* **21**:4090-4103.
- Rosenkranz J.A. & Grace A.A. (2002a) Cellular mechanisms of infralimbic and prelimbic prefrontal cortical inhibition and dopaminergic modulation of basolateral amygdala neurons in vivo. *J Neurosci* **22**:324-337.
- Rosenkranz J.A. & Grace A.A. (2002b) Dopamine-mediated modulation of odour-evoked amygdala potentials during pavlovian conditioning. *Nature* **417**:282-287.
- Rosenkranz J.A. & Grace A.A. (2003) Affective conditioning in the basolateral amygdala of anesthetized rats is modulated by dopamine and prefrontal cortical inputs. *Ann N Y Acad Sci* **985**:488-491.
- Rossetti Z.L., Hmaidan Y. & Gessa G.L. (1992) Marked inhibition of mesolimbic dopamine release: a common feature of ethanol, morphine, cocaine and amphetamine abstinence in rats. *Eur J Pharmacol* **221**:227-234.
- Rossetti Z.L., Longu G., Mercurio G. & Gessa G.L. (1993) Extraneuronal noradrenaline in the prefrontal cortex of morphine-dependent rats: tolerance and withdrawal mechanisms. *Brain Res* **609**:316-320.
- Rothman R.B., Bykov V., Long J.B., Brady L.S., Jacobson A.E., Rice K.C. & Holaday J.W. (1989) Chronic administration of morphine and naltrexone up-regulate mu-opioid binding sites labeled by [3H][D-Ala2,MePhe4,Gly-ol5]enkephalin: further evidence for two mu-binding sites. *Eur J Pharmacol* **160**:71-82.
- Rothman R.B., Danks J.A., Jacobson A.E., Burke T.R., Jr., Rice K.C., Tortella F.C. & Holaday J.W. (1986) Morphine tolerance increases mu-noncompetitive delta binding sites. *Eur J Pharmacol* **124**:113-119.
- Rouge-Pont F., Piazza P.V., Kharouby M., Le Moal M. & Simon H. (1993) Higher and longer stress-induced increase in dopamine concentrations in the nucleus accumbens of animals predisposed to amphetamine self-administration. A microdialysis study. *Brain Res* **602**:169-174.
- Royer S., Martina M. & Pare D. (1999) An inhibitory interface gates impulse traffic between the input and output stations of the amygdala. *J Neurosci* **19**:10575-10583.
- Sah P., Faber E.S., Lopez De Armentia M. & Power J. (2003) The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiol Rev* **83**:803-834.
- Sandner G., Oberling P., Silveira M.C., Di Scala G., Rocha B., Bagri A. & Depoortere R. (1993) What brain structures are active during emotions? Effects of brain stimulation elicited aversion on c-fos immunoreactivity and behavior. *Behav Brain Res* **58**:9-18.
- Schafe G.E., Nader K., Blair H.T. & Le Doux J.E. (2001) Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning: a cellular and molecular perspective. *Trends Neurosci* **24**:540-546.
- Schechter M.D. & Meechan S.M. (1994) Conditioned place aversion produced by dopamine release inhibition. *Eur J Pharmacol* **260**:133-137.
- Schenk S. & Partridge B. (1997) Sensitization and tolerance in psychostimulant self-administration. *Pharmacol Biochem Behav* **57**:543-550.
- Schmued L.C. (1994) Diagonal ventral forebrain continuum has overlapping telencephalic inputs and brainstem outputs which may represent loci for limbic/autonomic integration. *Brain Res* **667**:175-191.

- Schrater P.R., Russo A.C., Stanton T.L., Newman J.R., Rodriguez L.M. & Beckman A.L. (1993) Changes in striatal dopamine metabolism during the development of morphine physical dependence in rats: observations using in vivo microdialysis. *Life Sci* **52**:1535-1545.
- Schroeder B.E., Holahan M.R., Landry C.F. & Kelley A.E. (2000) Morphine-associated environmental cues elicit conditioned gene expression. *Synapse* **37**:146-158.
- Schulteis G., Ahmed S.H., Morse A.C., Koob G.F. & Everitt B.J. (2000) Conditioning and opiate withdrawal. *Nature* **405**:1013-1014.
- Schulteis G., Markou A., Gold L.H., Stinus L. & Koob G.F. (1994) Relative sensitivity to naloxone of multiple indices of opiate withdrawal: a quantitative dose-response analysis. *J Pharmacol Exp Ther* **271**:1391-1398.
- Schulteis G., Stinus L., Risbrough V.B. & Koob G.F. (1998) Clonidine blocks acquisition but not expression of conditioned opiate withdrawal in rats. *Neuropsychopharmacology* **19**:406-416.
- See R.E. (2002) Neural substrates of conditioned-cued relapse to drug-seeking behavior. *Pharmacol Biochem Behav* **71**:517-529.
- See R.E., Kruzich P.J. & Grimm J.W. (2001) Dopamine, but not glutamate, receptor blockade in the basolateral amygdala attenuates conditioned reward in a rat model of relapse to cocaine-seeking behavior. *Psychopharmacology (Berl)* **154**:301-310.
- Self D.W. & Nestler E.J. (1998) Relapse to drug-seeking: neural and molecular mechanisms. *Drug Alcohol Depend* **51**:49-60.
- Setlow B., Gallagher M. & Holland P.C. (2002a) The basolateral complex of the amygdala is necessary for acquisition but not expression of CS motivational value in appetitive Pavlovian second-order conditioning. *Eur J Neurosci* **15**:1841-1853.
- Setlow B., Holland P.C. & Gallagher M. (2002b) Disconnection of the basolateral amygdala complex and nucleus accumbens impairs appetitive pavlovian second-order conditioned responses. *Behav Neurosci* **116**:267-275.
- Shaham Y., Rajabi H. & Stewart J. (1996) Relapse to heroin-seeking in rats under opioid maintenance: the effects of stress, heroin priming, and withdrawal. *J Neurosci* **16**:1957-1963.
- Shalev U., Grimm J.W. & Shaham Y. (2002) Neurobiology of relapse to heroin and cocaine seeking: a review. *Pharmacol Rev* **54**:1-42.
- Shaw-Lutchman T.Z., Barrot M., Wallace T., Gilden L., Zachariou V., Impey S., Duman R.S., Storm D. & Nestler E.J. (2002) Regional and cellular mapping of cAMP response element-mediated transcription during naltrexone-precipitated morphine withdrawal. *J Neurosci* **22**:3663-3672.
- Shiekhhattar R. & Aston-Jones G. (1993) Modulation of opiate responses in brain noradrenergic neurons by the cyclic AMP cascade: changes with chronic morphine. *Neuroscience* **57**:879-885.
- Shippenberg T.S., Bals-Kubik R. & Herz A. (1993) Examination of the neurochemical substrates mediating the motivational effects of opioids: role of the mesolimbic dopamine system and D-1 vs. D-2 dopamine receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **265**:53-59.
- Shippenberg T.S. & Elmer G.I. (1998) The neurobiology of opiate reinforcement. *Crit Rev Neurobiol* **12**:267-303.
- Shippenberg T.S., Herz A., Spanagel R., Bals-Kubik R. & Stein C. (1992) Conditioning of opioid reinforcement: neuroanatomical and neurochemical substrates. *Ann N Y Acad Sci* **654**:347-356.
- Siegel S. (1999) Drug anticipation and drug addiction. The 1998 H. David Archibald Lecture. *Addiction* **94**:1113-1124.
- Sim L.J., Selley D.E., Dworkin S.I. & Childers S.R. (1996) Effects of chronic morphine administration on mu opioid receptor-stimulated [³⁵S]GTPgammaS autoradiography in rat brain. *J Neurosci* **16**:2684-2692.
- Simon E.J., Hiller J.M. & Edelman I. (1973) Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic (3H) Etorphine to rat-brain homogenate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**:1947-1949.
- Simonin F., Slowe S., Becker J.A., Matthes H.W., Filliol D., Chluba J., Kitchen I. & Kieffer B.L. (2001) Analysis of [3H]bremazocine binding in single and combinatorial opioid receptor knockout mice. *Eur J Pharmacol* **414**:189-195.
- Simonin F., Valverde O., Smadja C., Slowe S., Kitchen I., Dierich A., Le Meur M., Roques B.P., Maldonado R. & Kieffer B.L. (1998) Disruption of the kappa-opioid receptor gene in mice enhances sensitivity to chemical visceral pain, impairs pharmacological actions of the selective kappa-agonist U-50,488H and attenuates morphine withdrawal. *Embo J* **17**:886-897.
- Sim-Selley L.J., Selley D.E., Vogt L.J., Childers S.R. & Martin T.J. (2000) Chronic heroin self-administration desensitizes μ -opioid receptor-activated G-proteins in specific regions of rat brain. *J Neurosci* **20**:4555-4562.

- Sklair-Tavron L., Shi W.X., Lane S.B., Harris H.W., Bunney B.S. & Nestler E.J. (1996) Chronic morphine induces visible changes in the morphology of mesolimbic dopamine neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:11202-11207.
- Solomon R.L. & Corbit J.D. (1974) An opponent-process theory of motivation. I. Temporal dynamics of affect. *Psychol Rev* **81**:119-145.
- Sora I., Elmer G., Funada M., Pieper J., Li X.F., Hall F.S. & Uhl G.R. (2001) Mu opiate receptor gene dose effects on different morphine actions: evidence for differential in vivo mu receptor reserve. *Neuropsychopharmacology* **25**:41-54.
- Spanagel R., Herz A. & Shippenberg T.S. (1990) The effects of opioid peptides on dopamine release in the nucleus accumbens: an in vivo microdialysis study. *J Neurochem* **55**:1734-1740.
- Spanagel R. & Shoaib M. (1994) Involvement of mesolimbic kappa-opioid systems in the discriminative stimulus effects of morphine. *Neuroscience* **63**:797-804.
- Spangler R., Ho A., Zhou Y., Maggos C.E., Yuferov V. & Kreek M.J. (1996) Regulation of kappa opioid receptor mRNA in the rat brain by "binge" pattern cocaine administration and correlation with preprodynorphin mRNA. *Mol Brain Res* **38**:71-76.
- Spielewoy C., Gonon F., Roubert C., Fauchey V., Jaber M., Caron M.G., Roques B.P., Hamon M., Betancur C., Maldonado R. & Giros B. (2000) Increased rewarding properties of morphine in dopamine-transporter knockout mice. *Eur J Neurosci* **12**:1827-1837.
- Sternini C., Spann M., Anton B., Keith D.E., Jr., Bunnett N.W., von Zastrow M., Evans C. & Brecha N.C. (1996) Agonist-selective endocytosis of mu opioid receptor by neurons in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:9241-9246.
- Stewart J. (2000) Pathways to relapse: the neurobiology of drug- and stress-induced relapse to drug-taking. *J Psychiatry Neurosci* **25**:125-136.
- Stewart J. & Badiani A. (1993) Tolerance and sensitization to the behavioral effects of drugs. *Behav Pharmacol* **4**:289-312.
- Stewart J., de Wit H. & Eikelboom R. (1984) Role of unconditioned and conditioned drug effects in the self-administration of opiates and stimulants. *Psychol Rev* **91**:251-268.
- Stewart J. & Eikelboom R. (1986) Conditioned drug effects. In: *Handbook of psychopharmacology* (Iversen, ed), pp 1-57.
- Stinus L., Caillé S. & Koob G.F. (2000) Opiate withdrawal-induced place aversion lasts for up to 16 weeks. *Psychopharmacology* **149**:115-120.
- Stinus L., Le Moal M. & Koob G.F. (1990) Nucleus accumbens and amygdala are possible substrates for the aversive stimulus effects of opiate withdrawal. *Neuroscience* **37**:767-773.
- Sun N. & Cassell M.D. (1993) Intrinsic GABAergic neurons in the rat central extended amygdala. *J Comp Neurol* **330**:381-404.
- Sun N., Yi H. & Cassell M.D. (1994) Evidence for a GABAergic interface between cortical afferents and brainstem projection neurons in the rat central extended amygdala. *J Comp Neurol* **340**:43-64.
- Svingos A.L., Chavkin C., Colago E.E. & Pickel V.M. (2001) Major coexpression of kappa-opioid receptors and the dopamine transporter in nucleus accumbens axonal profiles. *Synapse* **42**:185-192.
- Swanson L.W. (1982) The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Res Bull* **9**:321-353.
- Swanson L.W. & Petrovich G.D. (1998) What is the amygdala? *Trends Neurosci* **21**:323-331.
- Tao R. & Auerbach S.B. (1994) Increased extracellular serotonin in rat brain after systemic or intraphe administration of morphine. *J Neurochem* **63**:517-524.
- Tao R. & Auerbach S.B. (1995) Involvement of the dorsal raphe but not median raphe nucleus in morphine-induced increases in serotonin release in the rat forebrain. *Neuroscience* **68**:553-561.
- Tao R., Ma Z. & Auerbach S.B. (1998) Alteration in regulation of serotonin release in rat dorsal raphe nucleus after prolonged exposure to morphine. *J Pharmacol Exp Ther* **286**:481-488.
- Taylor J.R., Elsworth J.D., Garcia E.J., Grant S.J., Roth R.H. & Redmond D.E., Jr. (1988) Clonidine infusions into the locus coeruleus attenuate behavioral and neurochemical changes associated with naloxone-precipitated withdrawal. *Psychopharmacology (Berl)* **96**:121-134.
- Taylor J.R. & Robbins T.W. (1986) 6-Hydroxydopamine lesions of the nucleus accumbens, but not of the caudate nucleus, attenuate enhanced responding with reward-related stimuli produced by intra-accumbens d-amphetamine. *Psychopharmacology (Berl)* **90**:390-397.

- Tempel A. & Zukin R.S. (1987) Neuroanatomical patterns of the mu, delta, and kappa opioid receptors of rat brain as determined by quantitative in vitro autoradiography. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:4308-4312.
- Terenius L. (1973) Stereospecific interaction between narcotic analgesics and a synaptic plasma membrane fraction of rat cerebral cortex. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* **32**:317-320.
- Terwilliger R.Z., Beitner-Johnson D., Sevarino K.A., Crain S.M. & Nestler E.J. (1991) A general role for adaptations in G-proteins and the cyclic AMP system in mediating the chronic actions of morphine and cocaine on neuronal function. *Brain Res* **548**:100-110.
- 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.
- Trafton J.A., Abbadie C., Marek K. & Basbaum A.I. (2000) Postsynaptic signaling via the mu-opioid receptor: responses of dorsal horn neurons to exogenous opioids and noxious stimulation. *J Neurosci* **20**:8578-8584.
- Tran-Nguyen L.T., Fuchs R.A., Coffey G.P., Baker D.A., O'Dell L.E. & Neisewander J.L. (1998) Time-dependent changes in cocaine-seeking behavior and extracellular dopamine levels in the amygdala during cocaine withdrawal. *Neuropsychopharmacology* **19**:48-59.
- Vaccarino F.J., Bloom F.E. & Koob G.F. (1985) Blockade of nucleus accumbens opiate receptors attenuates intravenous heroin reward in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* **86**:37-42.
- Valverde O., Tzavara E., Hanoune J., Roques B.P. & Maldonado R. (1996) Protein kinases in the rat nucleus accumbens are involved in the aversive component of opiate withdrawal. *Eur J Neurosci* **8**:2671-2678.
- Van der Kooy D., Mucha R.F., O'Shaughnessy M. & Bucenieks P. (1982) Reinforcing effects of brain microinjections of morphine revealed by conditioned place preference. *Brain Res* **243**:107-117.
- Van Ree J.M., Gerrits M.A. & Vanderschuren L.J. (1999) Opioids, reward and addiction: An encounter of biology, psychology, and medicine. *Pharmacol Rev* **51**:341-396.
- Vanderschuren L.J., De Vries T.J., Wardeh G., Hogenboom F.A. & Schoffelmeer A.N. (2001) A single exposure to morphine induces long-lasting behavioural and neurochemical sensitization in rats. *Eur J Neurosci* **14**:1533-1538.
- Vanderschuren L.J., Schmidt E.D., De Vries T.J., Van Moorsel C.A., Tilders F.J. & Schoffelmeer A.N. (1999) A single exposure to amphetamine is sufficient to induce long-term behavioral, neuroendocrine, and neurochemical sensitization in rats. *J Neurosci* **19**:9579-9586.
- Veinante P., Stoeckel M.E. & Freund-Mercier M.J. (1997) GABA- and peptide-immunoreactivities co-localize in the rat central extended amygdala. *Neuroreport* **8**:2985-2989.
- Volkow N.D., Fowler J.S., Wang G.J. & Goldstein R.Z. (2002) Role of dopamine, the frontal cortex and memory circuits in drug addiction: insight from imaging studies. *Neurobiol Learn Mem* **78**:610-624.
- von Zastrow M., Svingos A., Haberstock-Debic H. & Evans C. (2003) Regulated endocytosis of opioid receptors: cellular mechanisms and proposed roles in physiological adaptation to opiate drugs. *Curr Opin Neurobiol* **13**:348-353.
- Walters C.L., Aston-Jones G. & Druhan J.P. (2000) Expression of fos-related antigens in the nucleus accumbens during opiate withdrawal and their attenuation by a D2 dopamine receptor agonist. *Neuropsychopharmacology* **23**:307-315.
- Weiss F., Ciccocioppo R., Parsons L.H., Katner S., Liu X., Zorrilla E.P., Valdez G.R., Ben-Shahar O., Angeletti S. & Richter R.R. (2001) Compulsive drug-seeking behavior and relapse. Neuroadaptation, stress, and conditioning factors. *Ann N Y Acad Sci* **937**:1-26.
- Weiss F., Maldonado-Vlaar C.S., Parsons L.H., Kerr T.M., Smith D.L. & Ben-Shahar O. (2000) Control of cocaine-seeking behavior by drug-associated stimuli in rats: effects on recovery of extinguished operant-responding and extracellular dopamine levels in amygdala and nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:4321-4326.
- Weiss F., Markou A., Lorang M.T. & Koob G.F. (1992) Basal extracellular dopamine levels in the nucleus accumbens are decreased during cocaine withdrawal after unlimited-access self-administration. *Brain Res* **593**:314-318.
- Weiss F., Parsons L.H., Schulteis G., Hyttia P., Lorang M.T., Bloom F.E. & Koob G.F. (1996) Ethanol self-administration restores withdrawal-associated deficiencies in accumbal dopamine and 5-hydroxytryptamine release in dependent rats. *J Neurosci* **16**:3474-3485.
- Werling L.L., Brown S.R. & Cox B.M. (1987) Opioid receptor regulation of the release of norepinephrine in brain. *Neuropharmacology* **26**:987-996.
- Werling L.L., McMahon P.N. & Cox B.M. (1989) Selective changes in mu opioid receptor properties induced by chronic morphine exposure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:6393-6397.

- Whistler J.L., Chuang H.H., Chu P., Jan L.Y. & von Zastrow M. (1999) Functional dissociation of mu opioid receptor signaling and endocytosis: implications for the biology of opiate tolerance and addiction. *Neuron* **23**:737-746.
- White F.J., Hu X.T. & Zhang X.F. (1998) Neuroadaptations in nucleus accumbens neurons resulting from repeated cocaine administration. *Adv Pharmacol* **42**:1006-1009.
- White F.J. & Kalivas P.W. (1998) Neuroadaptations involved in amphetamine and cocaine addiction. *Drug Alcohol Depend* **51**:141-153.
- Whitelaw R.B., Markou A., Robbins T.W. & Everitt B.J. (1996) Excitotoxic lesions of the basolateral amygdala impair the acquisition of cocaine-seeking behaviour under a second-order schedule of reinforcement. *Psychopharmacology (Berl)* **127**:213-224.
- Wikler A. (1965) Conditioning factors in opiate addiction and relapse. In: *Narcotics* (Willner D.I., Kassenbaum G.G., eds), pp 7-21. New York: McGraw-Hill.
- Wikler A. (1973) Dynamics of drug dependence. Implications of a conditioning theory for research and treatment. *Arch Gen Psychiatry* **28**:611-616.
- Wikler A. & Pescor F.T. (1967) Classical conditioning of a morphine abstinence phenomenon, reinforcement of opioid-drinking behavior and "relapse" in morphine-addicted rats. *Psychopharmacologia* **10**:255-284.
- Wikler A., Pescor F.T., Miller D. & Norrell H. (1971) Persistent potency of a secondary (conditioned) reinforcer following withdrawal of morphine from physically dependent rats. *Psychopharmacologia* **20**:103-117.
- Williams J.T., Christie M.J. & Manzoni O. (2001) Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. *Physiol Rev* **81**:299-343.
- Wise R.A. (1978) Catecholamine theories of reward: a critical review. *Brain Res* **152**:215-247.
- Wise R.A. (1996a) Addictive drugs and brain stimulation reward. *Annu Rev Neurosci* **19**:319-340.
- Wise R.A. (1996b) Neurobiology of addiction. *Curr Opin Neurobiol* **6**:243-251.
- Wolf M.E. (1998) The role of excitatory amino acids in behavioral sensitization to psychomotor stimulants. *Prog Neurobiol* **54**:679-720.
- Wolterink G., Phillips G., Cador M., Donselaar-Wolterink I., Robbins T.W. & Everitt B.J. (1993) Relative roles of ventral striatal D1 and D2 dopamine receptors in responding with conditioned reinforcement. *Psychopharmacology (Berl)* **110**:355-364.
- Wright C.I., Beijer A.V. & Groenewegen H.J. (1996) Basal amygdaloid complex afferents to the rat nucleus accumbens are compartmentally organized. *J Neurosci* **16**:1877-1893.
- Wuster M., Schulz R. & Herz A. (1979) Specificity of opioids towards the mu-, delta- and epsilon-opiate receptors. *Neurosci Lett* **15**:193-198.
- Young A.W., Aggleton J.P., Hellawell D.J., Johnson M., Broks P. & Hanley J.R. (1995) Face processing impairments after amygdalotomy. *Brain* **118 (Pt 1)**:15-24.
- Zajac J.M. & Roques B.P. (1983) Differential properties of mu and delta opiate binding sites studied with highly selective ligands. *Life Sci* **33 Suppl 1**:155-158.

ARTICLE

*Neural correlates of the motivational and somatic components
of naloxone-precipitated morphine withdrawal*

European Journal of Neuroscience, Vol. 16, pp. 1377 – 1389, 2002

Neural correlates of the motivational and somatic components of naloxone-precipitated morphine withdrawal

François Frenois, Martine Cador, Stéphanie Caillé,* Luis Stinus and Catherine Le Moine

Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 5541 'Interactions Neuronales et Comportements', BP28, Université Victor Segalen, Bordeaux 2, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux cedex, France

Keywords: behaviour, *c-fos*, dose-effect, extended amygdala, *in situ* hybridization, mapping, rat brain

Abstract

In morphine-dependent rats, low naloxone doses have been shown to induce conditioned place aversion, which reflects the negative motivational component of opiate withdrawal. In contrast, higher naloxone doses are able to induce a 'full' withdrawal syndrome, including overt somatic signs. The *c-fos* gene is commonly used as a marker of neuronal reactivity to map the neural substrates that are recruited by various stimuli. Using *in situ* hybridization, we have analysed in the brain of morphine-dependent rats the effects of acute withdrawal syndrome precipitated by increasing naloxone doses on *c-fos* mRNA expression. Morphine dependence was induced by subcutaneous implantation of slow-release morphine pellets for 6 days and withdrawal was precipitated by increasing naloxone doses inducing the motivational (7.5 and 15 µg/kg) and somatic (30 and 120 µg/kg) components of withdrawal. Our mapping study revealed a dissociation between a set of brain structures (extended amygdala, lateral septal nucleus, basolateral amygdala and field CA1 of the hippocampus) which exhibited *c-fos* mRNA dose-dependent variations from the lowest naloxone doses, and many other structures (dopaminergic and noradrenergic nuclei, motor striatal areas, hypothalamic nuclei and periaqueductal grey) which were less sensitive and recruited only by the higher doses. In addition, we found opposite dose-dependent variations of *c-fos* gene expression within the central (increase) and the basolateral (decrease) amygdala after acute morphine withdrawal. Altogether, these results emphasize that limbic structures of the extended amygdala along with the lateral septal nucleus, the basolateral amygdala and CA1 could specifically mediate the negative motivational component of opiate withdrawal.

Introduction

Chronic opiate consumption leads to dependence, and acute abstinence produces an intense withdrawal syndrome. Desire to avoid this aversive state is proposed as contributing to the compulsive nature of opiate abuse (Koob, 1996; Bechara *et al.*, 1998). In morphine-dependent rats, naloxone-precipitated withdrawal is characterized by the emergence of a general negative affective state (Mucha, 1987; Higgins & Sellers, 1994) and by many somatic signs (Gellert & Holtzman, 1978; Espejo *et al.*, 1995). The most sensitive behavioural index reflecting the negative motivational aspect of withdrawal is naloxone-induced conditioned place aversion (Mucha, 1987; Hand *et al.*, 1988; Stinus *et al.*, 1990) which can be clearly revealed with a very low naloxone dose (7.5 µg/kg) (Caillé *et al.*, 1999) and lasts for >4 months (Stinus *et al.*, 2000). In contrast, at least 30 µg/kg of naloxone is required to elicit some of the somatic signs of withdrawal (Schulteis *et al.*, 1994).

Studies using brain lesions, intracerebral injections of opiate antagonists or immediate-early genes as markers of neuronal reactivity have shown that no single brain area is responsible for the opiate withdrawal syndrome (for reviews: Koob *et al.*, 1992; Harlan & Garcia, 1998). Nevertheless, these studies have emphasized

that the motivational and somatic aspects of opiate dependence might be dissociated in terms of neural substrates, as previously proposed (Bozarth & Wise, 1984). The motivational component appears to be centrally mediated by limbic structures such as the nucleus accumbens, amygdala (Hand *et al.*, 1988; Stinus *et al.*, 1990; Heinrichs *et al.*, 1995) and bed nucleus of the stria terminalis (BNST) (Delfs *et al.*, 2000). Conversely, the somatic aspect of withdrawal seems to be more related to mesencephalic and autonomic brain areas. Indeed, local injections of methylnaloxonium have revealed that the most sensitive structures in inducing somatic signs were the locus coeruleus and periaqueductal grey area, whereas the least sensitive ones were the amygdala and nucleus accumbens (Maldonado *et al.*, 1992).

However, the neural substrates underlying the motivational and somatic components of opiate withdrawal are still unclear. For instance, D2 receptor-mediated effects in the nucleus accumbens have been directly involved in somatic signs of withdrawal (Harris & Aston-Jones, 1994; Walters *et al.*, 2000) and, in contrast, a total lesion of noradrenergic neurons of the locus coeruleus did not alter naloxone-precipitated morphine withdrawal (Caillé *et al.*, 1999), challenging the idea that this structure plays a major role in inducing somatic signs (Aghajanian, 1978; Maldonado, 1997). It is therefore difficult to reconcile these data because there is no systematic study mapping extensively the brain structures recruited after precipitated morphine withdrawal using a full range of naloxone doses.

To enlighten the neurobiological pathways underlying the motivational and somatic components of morphine withdrawal, we have

Correspondence: Dr François Frenois, as above.

E-mail: francois.frenois@umr5541.u-bordeaux2.fr

**Present address:* The Scripps Research Institute, Department of Neuropharmacology, CVN-7, 10550 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, USA

Received 12 April 2002, revised 22 July 2002, accepted 29 July 2002

doi:10.1046/j.1460-9568.2002.02187.x

examined *c-fos* labelling in the rat brain after naloxone-precipitated withdrawal and quantified its mRNA expression in 18 cerebral structures, by using quantitative *in situ* hybridization. Expression of *c-fos* mRNA was quantified in response to various naloxone doses which have been chosen on the basis of a global analysis of behavioural data: 7.5 and 15 µg/kg (which induced a withdrawal-associated aversive state) vs. 30 and 120 µg/kg (which produced a withdrawal syndrome with somatic signs).

Materials and methods

Global analysis of behavioural data

We have re-analysed behavioural data previously obtained in our laboratory (Caillé *et al.*, 1999; S. Caillé and L. Stinus, unpublished data) in order to determine the ED₅₀ values for both naloxone-induced conditioned place aversion and various somatic signs of withdrawal. These ED₅₀ values represent a quantitative estimation of naloxone sensitivity, and allowed us to extract the most relevant naloxone doses to discriminate between the motivational and somatic components of morphine withdrawal. This global analysis was performed using data from a total of 1154 Sprague-Dawley male rats.

In these morphine-dependent rats, the acute naloxone-precipitated withdrawal syndrome has been ethopharmacologically quantified as previously described (Espejo *et al.*, 1995), using several doses of naloxone (0, 10, 15, 50, 100 and 1000 µg/kg). The following somatic signs were quantified: body shake, mastication, writhing, weight loss, vocalization, jumping, diarrhoea and salivation. Raw data obtained for each somatic sign relative to naloxone doses were averaged, normalized to the dose which produces the maximal effect (i.e. 100 µg/kg), and pooled. The normalized means were plotted against the logarithm of naloxone doses, and nonlinear regression curve fittings means were generated using Prism 3.0 software (GraphPad Software, San Diego, USA), allowing determination of the ED₅₀ values. Similarly, we have re-analysed raw data obtained for naloxone-induced conditioned place aversion experiments (0, 1.8, 3.75, 7.5, 15, 30 and 120 µg/kg) to determine the ED₅₀ value for the expression of this index of the motivational component of morphine withdrawal. The aversion score for one arm of an unbiased Y-maze, which had been previously paired with a naloxone injection during the conditioning phase, has been measured as previously described (Caillé *et al.*, 1999).

Animals

Ninety-seven Sprague-Dawley male rats (IFFA-CREDO, Lyon, France) weighting 180–200 g at the beginning of the experiments, were used. Animals were randomly assigned and housed collectively (four per cage) in a thermoregulated room (22 °C) with a 12-h light : 12-h dark cycle (light from 08.00 to 20.00 h). All the experiments were conducted during the light cycle. Food and water were available *ad libitum*. Care was taken that all the animals were handled every day for 10 days before the experiments. All surgical and experimental procedures were performed in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and with the 'Centre National de la Recherche Scientifique' approval.

Measurement of conditioned place aversion induced by naloxone in placebo animals

This experiment was designed to verify that naloxone is not aversive by itself in control animals in our experimental conditions. Sixty-eight rats were implanted with two placebo pellets (National Institute

on Drug Abuse, USA) under anaesthesia (halothane/O₂; induction 4/100 v/v for 10 s, followed by 1.5/100 v/v for 30 s), before being assigned to the experiment. The conditioned place aversion apparatus consisted of an unbiased Y-maze made of three rectangular boxes (40 × 33 × 34 cm), arranged radially (120°) and each distinguished by visual and tactile cues: black dots/smooth, black stripes/medium rough, and white/rough. Each compartment was equipped with five infrared photocells, allowing automatic detection and computer recording of an animal position every second. Four of these setups were placed in a sound-attenuating room, with white noise (75 dB), and were illuminated by a 15-W red light located 1.5 m above each setup.

In the preconditioning phase (4 days after implantation), rats were allowed to explore the entire maze and the time spent in each compartment was recorded for 20 min. For each rat, one compartment was chosen to be paired to naloxone, and another to saline as previously described (Caillé *et al.*, 1999). After the compartment assignment, *post hoc* Dunn's multiple comparison test showed that there were no differences between the time spent in the naloxone-paired (411.6 ± 3.7 s) and the saline-paired (417.4 ± 6.4 s) compartments ($P > 0.05$) during the preconditioning phase, but that these two compartments were both different from the third (neutral) compartment (371.0 ± 7.8 s, $P < 0.001$ in both cases) (Kruskal–Wallis, $F = 56.09$, $P < 0.0001$).

In the conditioning phase, rats received a subcutaneous injection of saline on days 5, 7 and 9 after pellet implantation before being confined to their saline-paired compartment for 20 min. Alternatively, on days 6, 8 and 10 after pellet implantation, rats received an injection of naloxone (subcutaneous) before being confined to their naloxone-paired compartment for 20 min. Naloxone hydrochloride (RBI/Sigma-Aldrich, France) was dissolved in isotonic saline and seven doses were used (naloxone doses were expressed as free base; 1 mg of naloxone base = 1.113 mg of naloxone hydrochloride): 0 ($n = 16$), 7.5 ($n = 8$), 15 ($n = 8$), 30 ($n = 8$), 120 ($n = 8$), 240 ($n = 10$) and 1000 µg/kg ($n = 10$).

The testing phase consisted of a free exploration of the Y-maze for 20 min on days 11 and 12 after pellet implantation (i.e. 24 and 48 h after the final conditioning session). A place aversion score was calculated as the difference between the time spent in a given compartment during the postconditioning (mean of the 24- and 48 h-tests) and during the preconditioning phase. Statistical analysis was performed using the Wilcoxon matched pairs test which compares the difference between the time spent in a given compartment before and after conditioning.

Induction of morphine dependence

For the 29 remaining rats, morphine dependence was induced by subcutaneous implantation of two slow-release morphine-containing pellets (75 mg of morphine base each, National Institute on Drug Abuse, USA), as described above. Full dependence on morphine was achieved 24 h after implantation of the morphine pellets and remained constant for 15 days (Gold *et al.*, 1994). Morphine withdrawal was precipitated on day 6 postimplantation by subcutaneous injection of naloxone hydrochloride (RBI/Sigma-Aldrich, France) dissolved in isotonic saline. Naloxone doses were chosen based on the global analysis of behavioural data: 0 (control group, $n = 5$), 7.5 ($n = 6$), 15 ($n = 6$), 30 ($n = 6$) and 120 µg/kg ($n = 6$). Rats were killed by decapitation 60 min after the injections. The brains were dissected and frozen into vapors of liquid nitrogen without prior fixation. Serial coronal cryostat sections (12 µm) were collected on gelatin-coated slides and stored at –80 °C until use.

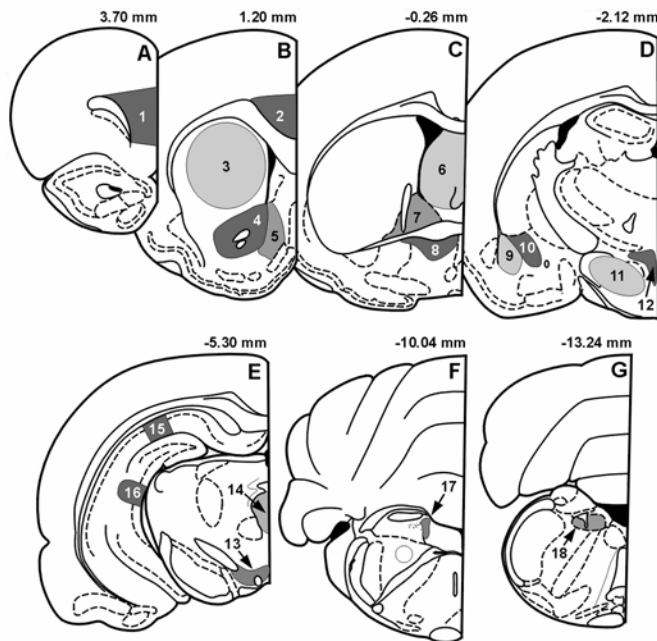


FIG. 1. Anatomical levels and cerebral structures analysed for *c-fos* mRNA expression after naloxone-precipitated morphine withdrawal (from Paxinos & Watson, 1997). (A–G) Rostro-caudal anatomical levels used for quantification and their distance from bregma in mm. Anatomical densitometric analysis was performed in the caudate–putamen, the lateral septal nucleus, the prelimbic and cingulate cortices, and in the hypothalamic nuclei. In all the other brain areas, the labelled neurons were counted as described in Materials and Methods. (D) Note that the area in which *c-fos* mRNA expression was quantified in the CeA includes the capsular as well as the lateral part, because of the difficulty to clearly separate these two nuclei on our material. Eighteen brain regions were quantified: 1, Prelimbic cortex; 2, Cingulate cortex; 3, Caudate–Putamen (striatum); 4, Accumbens nucleus core; 5, Accumbens nucleus shell medial part; 6, Lateral septal nucleus; 7, Bed nucleus of the stria terminalis dorsal part; 8, Bed nucleus of the stria terminalis ventral part; 9, Basolateral amygdala; 10, Central amygdala; 11, Lateral hypothalamic area; 12, Paraventricular hypothalamic nucleus; 13, Ventral tegmental area; 14, Periaqueductal grey; 15, Field CA1 of the hippocampus; 16, Field CA3 of the hippocampus; 17, Locus coeruleus; 18, Nucleus of the solitary tract.

Probe synthesis and labelling for in situ hybridization

Antisense ^{35}S -labelled cRNA probe was prepared by *in vitro* transcription from cDNA clones corresponding to fragment of the rat *c-fos* cDNA (Curran *et al.*, 1987). Transcriptions were performed from 100 ng of linearized plasmid (pSP65, coding sequence 2.1 kb) using ^{35}S -UTP (> 1000 Ci/mmol; Perkin Elmer Life Sciences, France) and SP6 RNA polymerase (Roche Diagnostics, France) as described previously (Le Moine *et al.*, 1997). After alkaline hydrolysis to obtain 250-bp cRNA fragments, the ^{35}S -labelled probes were purified on G50-Sephadex, then precipitated in 3 M sodium acetate/absolute ethanol (0.1/2.5 v/v), pH 5.0.

In situ hybridization experiments

Sections were postfixed in 4% paraformaldehyde for 5 min at room temperature, rinsed twice in $4 \times$ sodium chloride–sodium citrate buffer (SSC) and placed into 0.1 M triethanolamine/ $4 \times$ SSC, pH 8.0, for 10 min at room temperature; 0.25% acetic anhydride was added for the last 5 min. After dehydration in graded alcohols, sections were hybridized overnight at 55 °C with 1×10^6 cpm of antisense ^{35}S -labelled *c-fos* probe in 50 μL hybridization buffer (20 mM Tris–HCl, 1 mM EDTA, 300 mM NaCl, 50% formamide,

10% dextran sulphate, 1% Denhardt, 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ yeast tRNA, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ salmon sperm DNA, 0.1% SDS, 0.1% sodium thiosulphate). The slides were washed in $4 \times$ SSC (5 min, three times), 20 mg/mL RNase A (20 min at 37 °C) (Roche Diagnostics, France), $2 \times$ SSC (10 min), $1 \times$ SSC (5 min), $0.5 \times$ SSC (5 min) at room temperature, and placed in $0.1 \times$ SSC at 65 °C (30 min, twice) before being dehydrated in graded alcohols (the latter SSC washes contained 1 mM dithiothreitol). The slides were dipped into Ilford K5 emulsion (diluted 1 : 3 in $1 \times$ SSC), dried and then apposed to a Biomax MR X-ray film (Kodak) for 1 month. For microautoradiography, sections were developed and fixed after three months of exposure in the dark, then stained with Mayer's hemalum.

For each experiment, sections were processed equally across all the experimental groups, with the same ^{35}S -labelled *c-fos* probe as well as the same buffers and emulsion, to ensure labelling comparison for each anatomical level (illustrated in Fig. 1).

Data analysis

Levels of *c-fos* mRNA expression were quantified by densitometry on X-ray film as well as by neuronal counting as previously described (Le Moine, 2000), depending on the cerebral structures examined (see Fig. 1 for details) (Paxinos & Watson, 1997). Densitometric measurement was chosen for areas which can be easily delineated on X-ray films under basal conditions [lateral septal nucleus (LS), caudate–putamen (CPu), cortical and hypothalamic areas] whereas cellular analysis was chosen for structures which needed a more accurate delineation with specific landmarks [accumbens nucleus shell and core (AcbS, AcbC), bed nucleus of the stria terminalis (BNST), amygdala, ventral tegmental area (VTA), locus coeruleus (LC), nucleus of the solitary tract (NTS), hippocampus and periaqueductal grey (PAG)]. Previous work has shown that there is an excellent correlation between densitometric and cellular analysis for *c-fos* gene expression in similar experimental conditions (Georges *et al.*, 2000), where an increase in labelling corresponds to an increase in the number of labelled neurons. Regional densitometric analysis was performed using an image analyser system (Densirag 200; Biocom, Les Ulis, France) allowing measurement of grey levels (relative to radioactivity concentrations) and transformation in optical density. At the cellular level, labelled neurons were counted using an image analyser system for cartography (VisioScan 200, Biocom). Accordingly, a labelled neuron corresponded to a density of silver grains at least two-fold higher than background. Two sections per animal were counted for the densitometric analysis and one section per animal was analysed for neuronal counting. In each cerebral structure examined, levels of optical density as well as number of *c-fos*-positive neurons per mm^2 were pooled and averaged for each group. Statistical analysis was performed on individual raw data using analysis of variance (ANOVA) followed by *post hoc* Newman–Keuls multiple comparison test, which compares variations for all naloxone doses by pairs. Mean values are expressed \pm SEM.

Results

Global analysis and behavioural data

The determination of the ED_{50} values for each somatic sign of withdrawal (Fig. 2, upper panel, grey box) revealed that body shake, mastication, writhing and vocalization were highly sensitive to naloxone, as reflected by their low ED_{50} values (8.3, 8.9, 10.7 and 11.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively). In contrast, the ED_{50} values for weight loss, jumping, diarrhoea and salivation were higher (21.2, 30.0, 32.2 and 67.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively). Consequently, somatic signs were

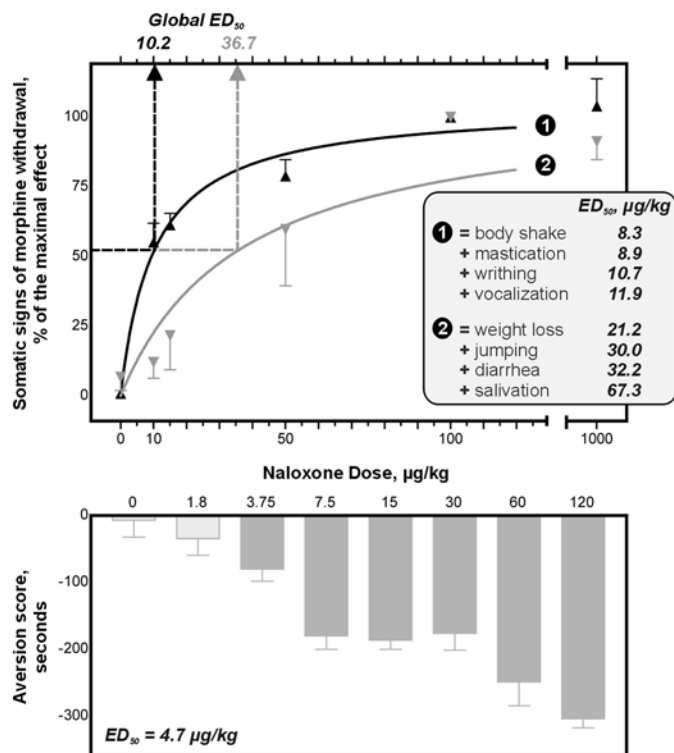


Fig. 2. Global behavioural analysis of naloxone-precipitated morphine withdrawal. The upper panel (curves) shows the expression of two groups of somatic signs of withdrawal (means \pm SEM) in response to naloxone injection doses (0, 10, 15, 50, 100 and 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$). The first group is represented by the black curve that fits the means of the signs showing an $\text{ED}_{50} < 20 \mu\text{g}/\text{kg}$ (body shake, mastication, writhing and vocalization). The second group is represented by the grey curve that fits the means of the signs showing an $\text{ED}_{50} > 20 \mu\text{g}/\text{kg}$ (weight loss, jumping, diarrhoea and salivation). The global ED_{50} values corresponding to the first and the second group of somatic signs were, respectively, 10.2 and 36.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The lower panel (histogram) shows the expression of naloxone-induced conditioned place aversion (0, 1.8, 3.75, 7.5, 15, 30 and 120 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Each bar represents the aversion score (means \pm SEM) for one arm of an unbiased Y-maze, which had been previously paired with a naloxone injection during the conditioning phase (dark grey histograms illustrate significant aversions).

classified in relation to their sensitivity to naloxone and subdivided into two groups depending on their ED_{50} values. The first group included signs showing an $\text{ED}_{50} < 20 \mu\text{g}/\text{kg}$ (body shake, mastication, writhing and vocalization), and the second group included signs showing an $\text{ED}_{50} > 20 \mu\text{g}/\text{kg}$ (weight loss, jumping, diarrhoea and salivation). The global ED_{50} was 10.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for the first group and 36.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for the second group (Fig. 2, upper panel). It is important to note that the signs which constitute the first group are related to states of fear, anxiety and malaise, whereas the signs in the second group are rather related to peripheral manifestations. The conditioned place-aversion scores showed a dose-dependent increase across naloxone doses (Fig. 2, lower panel) and the sensitivity to naloxone of this behavioural index, which reveals the negative motivational component of morphine withdrawal, was very low as reflected by its ED_{50} value (4.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

This global analysis showed that 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ represents a critical dose in naloxone sensitivity of the multiple behavioural indices of withdrawal. Thus, in order to cover all features of morphine withdrawal (motivational and somatic), two naloxone doses $< 20 \mu\text{g}/\text{kg}$ (7.5 and 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and two doses above this limit (30 and 120 $\mu\text{g}/\text{kg}$) were chosen for the analysis of *c-fos* gene expression.

In order to verify that these doses of naloxone were not aversive by themselves in our experimental conditions, we measured naloxone-induced conditioned place aversion in placebo rats. The aversion scores for each compartment regarding the doses of naloxone used during the conditioning phase (0, 7.5, 15, 30, 120, 240 and 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) are illustrated in Fig. 3. There was no statistical difference between the time spent in each compartment before and after the

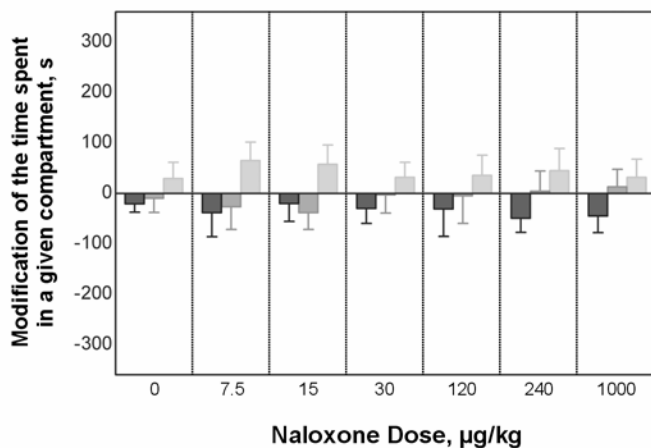


Fig. 3. Naloxone-induced conditioned place aversion in placebo rats. Place aversion conditioning was induced by the following increasing doses of naloxone: 0, 7.5, 15, 30, 120, 240 and 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Each bar represents the changes in time spent in a given compartment during the test phase relative to the preconditioning phase (means \pm SEM). Black bars, naloxone-paired compartment; dark grey bars, saline-paired compartment; light grey bars, neutral compartment. None of the doses of naloxone used during the conditioning sessions was able to induce a place aversion in placebo rats (Wilcoxon matched pairs test, n.s. for all compartment whatever the naloxone dose used).

conditioning session, whatever the naloxone dose used, including doses $> 120 \mu\text{g}/\text{kg}$ (Wilcoxon matched pairs test, $P > 0.1$ for all compartments). Thus, the mapping of naloxone-induced *c-fos*

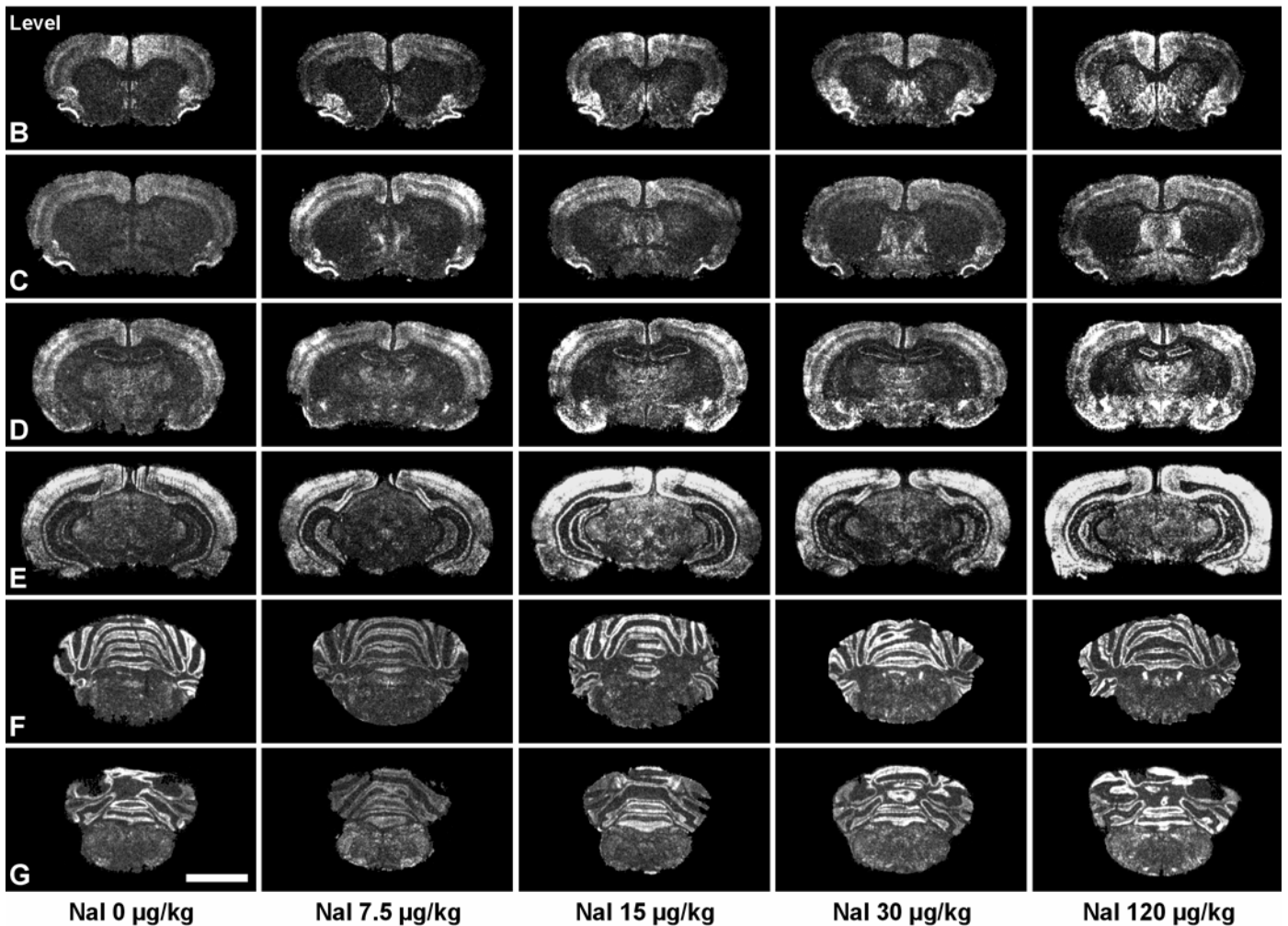


FIG. 4. Mapping of *c-fos* mRNA expression in the rat brain after naloxone-precipitated morphine withdrawal. Negative images of X-ray film after *in situ* hybridization showing the expression of *c-fos* mRNA in the rat brain along the rostro-caudal axis. Maps B–G correspond to the anatomical levels described in Fig. 2. Withdrawal was precipitated with increasing naloxone doses (0, 7.5, 15, 30 and 120 µg/kg). The regions showing a *c-fos* mRNA expression appear in white. From the lowest naloxone doses (7.5 or 15 µg/kg), the level of *c-fos* mRNA expression was increased in particular in the nucleus accumbens (B), the lateral septum (C), the BNST (C) and the CeA (D). Higher naloxone doses (30 or 120 µg/kg) elicited an induction of *c-fos* mRNA in a number of other brain areas, including the CPu (B,C), thalamic and hypothalamic areas (D and E), the LC (F) and the NTS (G). Scale bar, 5 mm.

mRNA expression was performed only in morphine-dependent rats which, in contrast to placebo rats, demonstrated a naloxone-induced conditioned place aversion with very low doses (Fig. 2, lower panel).

Mapping of *c-fos* mRNA expression in the rat brain after naloxone-precipitated morphine withdrawal

Basal levels of *c-fos* mRNA in subcortical structures of control rats were weak whereas the cerebellum and some cortical areas exhibited a significant *c-fos* labelling (Fig. 4, Nal 0 µg/kg). Morphine withdrawal was associated with an increase in *c-fos* mRNA expression in a number of brain areas after injections of different doses of naloxone (Fig. 4). However, the sensitivity to naloxone of these brain structures was very different across doses. Specifically, limbic areas of the extended amygdala exhibited *c-fos* inductions from the lowest doses of naloxone (i.e. 7.5 or 15 µg/kg). For instance, an intense induction of *c-fos* mRNA was detected in the BNST and the CeA

after an injection of naloxone of 7.5 µg/kg (Fig. 4 levels C and D) and *c-fos* expression was detected in the nucleus accumbens and others amygdaloid areas, including medial, basomedial and cortical nuclei, with 15 µg/kg. The hippocampus and subiculum also exhibited *c-fos* labelling from the lowest doses of naloxone (Fig. 4, level E). In contrast, a number of other cerebral structures, including striatal areas (Fig. 4, level B), thalamic and hypothalamic nuclei (Fig. 4, level D), and noradrenergic and dopaminergic nuclei (Fig. 4, levels E–G) showed detectable *c-fos* mRNA expression only after injections of higher doses of naloxone (i.e. 30 or 120 µg/kg). Also note that an intense *c-fos* labelling was detected in a number of cortical areas after injections of the different doses of naloxone, some of which also exhibited a high basal level of *c-fos* expression in control conditions. Quantitative analysis was performed on 18 brain structures (illustrated in Fig. 1), which were selected on the basis of their possible involvement in the motivational and/or somatic components of the opiate withdrawal syndrome.

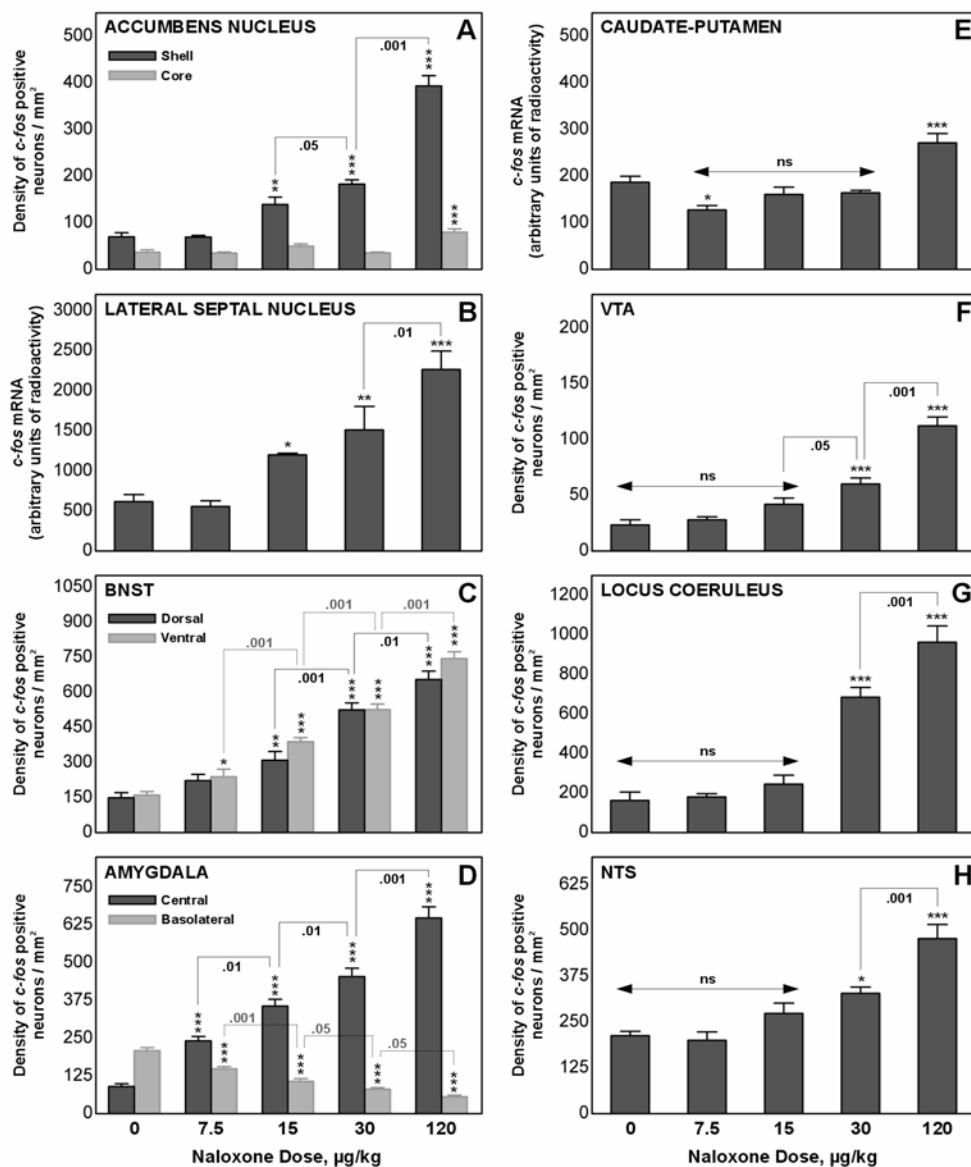


FIG. 5. Quantitative measurements of *c-fos* mRNA expression after morphine withdrawal precipitated by different doses of naloxone. (A–H) Histograms showing the variations of *c-fos* mRNA expression across increasing naloxone doses (0, 7.5, 15, 30 and 120 µg/kg) measured in the different brain areas. Depending on the analysis, each bar represents means \pm SEM of (B and E) the optical density values or (A, C, D and F–H) the number of *c-fos*-positive neurons per mm². Levels of *c-fos* mRNA were dose-dependently increased from the lowest naloxone doses (7.5 or 15 µg/kg) in limbic structures of the extended amygdala (AcBS, BNSTd, BNSTv and CeA) as well as in the LS, but decreased in the BIA. Conversely, higher naloxone doses (30 or 120 µg/kg) were required to induce *c-fos* in the other structures (CPu, VTA, LC and NTS). An ANOVA was performed for each region [$P < 0.0001$ for AcbS ($F_{4,23} = 92.78$), AcbC ($F_{4,23} = 18.93$), LS ($F_{4,24} = 15.22$), BNSTd ($F_{4,24} = 43.81$), BNSTv ($F_{4,24} = 85.09$), CeA ($F_{4,24} = 69.50$), BIA ($F_{4,24} = 58.71$), CPu ($F_{4,24} = 16.21$), VTA ($F_{4,23} = 42.19$), LC ($F_{4,23} = 49.29$) and NTS ($F_{4,20} = 19.42$)] followed by *post hoc* Newman–Keuls multiple comparison test: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ vs. control (Nal 0 µg/kg). The significant *P*-values between naloxone doses are specified on graphs ('.05', $P < 0.05$; '.01', $P < 0.01$; '.001', $P < 0.001$).

Quantitative measurements of *c-fos* mRNA expression after morphine withdrawal precipitated by different doses of naloxone

Striatal areas, lateral septal nucleus and structures of the extended amygdala

In the medial AcbS (Fig. 5A), the density of *c-fos*-expressing neurons was increased after a naloxone dose of 15 µg/kg (+98%, $P < 0.01$ vs. control), whereas in the AcbC (Fig. 5A) and in the CPu (Fig. 5E), 120 µg/kg was required to induce *c-fos* mRNA (+116% for AcbC;

+45% for CPu; $P < 0.001$ vs. control). In addition, the increase in *c-fos* mRNA expression measured in the AcbS was dose-dependent between 15 and 120 µg/kg (see Fig. 5A for significance), and this structure exhibited the highest intensity of *c-fos* induction after 120 µg/kg (+459%, $P < 0.001$ vs. control) compared to the AcbC and the CPu. Also note that, in the CPu, levels of *c-fos* mRNA were decreased after an injection of naloxone of 7.5 µg/kg as compared to control conditions (–32%, $P < 0.05$).

In the LS, naloxone-precipitated withdrawal elicited a similar pattern of *c-fos* labelling to that in the AcbS (Fig. 5B). Indeed, the

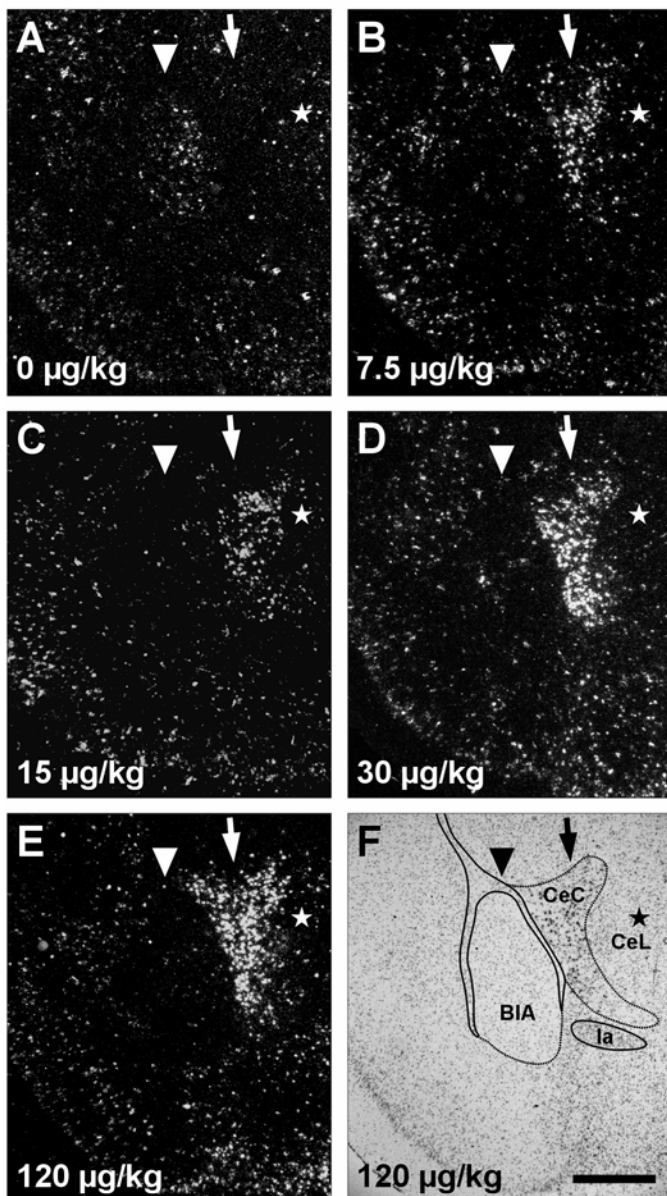


FIG. 6. Expression of *c-fos* mRNA in the amygdala after naloxone-precipitated morphine withdrawal. (A) Dark-field photomicrograph showing the basal levels of *c-fos* mRNA in the amygdala of control rats. (B-E) Dark-field photomicrograph showing the expression of *c-fos* mRNA in the amygdala after injections of increasing doses of naloxone. Neurons showing a *c-fos* mRNA expression appear in white. White arrowheads point to the basolateral nucleus (BIA) and white arrows point to the central nucleus of the amygdala (CeA). The BIA exhibits a higher basal level of *c-fos* mRNA than the CeA. The expression of *c-fos* was dose-dependently increased in the CeA but decreased in the BIA from naloxone 7.5 µg/kg. Naloxone-induced *c-fos* mRNA expression in the CeA was mostly restricted to the capsular part (CeC), whereas labelling in the lateral part (CeL) was scarce (the white stars indicate the CeL). (F) Bright-field photomicrograph corresponding to the section shown in E, and delineating the subdivisions in the amygdala (Ia, intercalated nuclei of the amygdala). Scale bar, 1 mm.

induction of *c-fos* mRNA expression in the LS was dose-dependent (see Fig. 5B for significance), starting from naloxone 15 µg/kg (+95%, $P < 0.05$ vs. control), and reached +266% ($P < 0.001$ vs. control) after 120 µg/kg.

In the ventral and dorsal parts of the bed nucleus of the stria terminalis (BNSTv and BNSTd; Fig. 5C), the density of *c-fos*-

positive neurons was increased after an injection of naloxone 7.5 µg/kg (+48%, $P < 0.05$ vs. control for BNSTv; +49% for BNSTd), although the increase measured in the BNSTd did not reach statistical significance. In both subdivisions of the BNST, inductions of *c-fos* mRNA were dose-dependent between 7.5 and 120 µg/kg (see Fig. 5C for significance) and these variations were fairly similar in intensity for each dose of naloxone. After an injection of 120 µg/kg, levels of *c-fos* mRNA reached +360% for BNSTv and +337% for BNSTd ($P < 0.001$) as compared to control conditions.

In the amygdala, the number of *c-fos*-expressing neurons was measured in the central and basolateral nuclei (CeA and BIA, Figs 5D and 6). In control conditions, the basal level of *c-fos* mRNA was significantly higher in the BIA than in the CeA (209 ± 9 neurons per mm² in the BIA and 91 ± 8 in the CeA; $P < 0.0001$, paired *t*-test) (Figs 5D and 6A). These amygdaloid nuclei were very sensitive to naloxone injections as they demonstrated strong variations of *c-fos* mRNA expression from the lowest dose (i.e. 7.5 µg/kg, Fig. 5D). Furthermore, these naloxone-induced variations were opposite because an activation was detected in the CeA whereas *c-fos* expression was inhibited in the BIA compared to control conditions (Figs 5D, and 6A and B). Indeed, naloxone-precipitated morphine withdrawal with 7.5 µg/kg induced a strong increase in *c-fos* expression in the CeA (+166%, $P < 0.001$ vs. control), whereas the density of *c-fos*-positive neurons in the BIA was decreased compared to control conditions (-29%, $P < 0.001$ vs. control). In addition, the induction of *c-fos* expression in the CeA as well as the decrease measured in the BIA were both dose-dependent between 7.5 and 120 µg/kg (see Fig. 5D for significance). These opposite dose-dependent variations in *c-fos* mRNA levels measured in the CeA and the BIA are illustrated in Fig. 6. In the different CeA subdivisions, the majority of naloxone-induced *c-fos* expression was restricted to the capsular part (Fig. 6, white arrows), whereas labelling in the lateral part was less intense (Fig. 6, white stars). The highest variations in *c-fos* expression were measured when morphine withdrawal was precipitated by naloxone 120 µg/kg (+614% for the CeA, -73% for the BIA; $P < 0.001$ vs. control). In this situation, the difference in the intensity of *c-fos* labelling between the two nuclei was very large, as reflected by the high density of *c-fos*-positive neurons measured in the CeA (649 ± 37) whereas only 56 ± 6 neurons per mm² in the BIA were expressing *c-fos* mRNA (Figs 5D and 6E). Also note that the CeA was the brain area most sensitive to naloxone injections as this nucleus exhibited the strongest inductions of *c-fos* mRNA whatever the doses of naloxone used (+166, +293, +400 and +614% compared to control conditions with, respectively, 7.5, 15, 30 and 120 µg/kg).

Dopaminergic and noradrenergic nuclei

In the VTA (Fig. 5F), the LC (Fig. 5G) and the NTS (Fig. 5H), significant inductions of *c-fos* mRNA levels were detected with naloxone 30 µg/kg and further increases were measured with 120 µg/kg. In the VTA, basal levels of *c-fos* mRNA were very low (23 ± 5 neurons per mm² in control rats) and the density of *c-fos*-positive neurons was strongly increased after naloxone 30 and 120 µg/kg (+158 and +381%, $P < 0.001$ vs. control, respectively). The LC also exhibited very intense inductions after either 30 or 120 µg/kg (+321 and +492%, $P < 0.001$ vs. control, respectively) in comparison to the density of *c-fos*-expressing neurons measured in the NTS (+54%, $P < 0.05$ and +124%, $P < 0.001$ vs. control, respectively). Indeed, the number of *c-fos*-positive neurons per mm² reached 963 ± 83 in the LC with 120 µg/kg (compared to

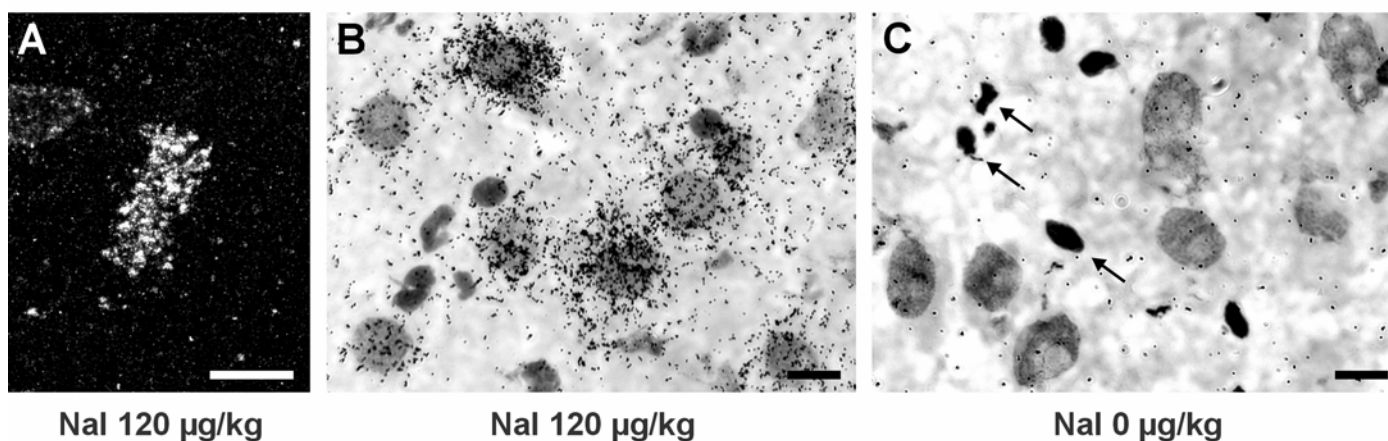


FIG. 7. Photomicrographs illustrating the expression of *c-fos* mRNA detected in the locus coeruleus. (A) Dark-field photomicrographs showing the strong induction of *c-fos* mRNA in the locus coeruleus after precipitated morphine withdrawal using naloxone 120 µg/kg. Neurons showing a *c-fos* induction appear in white. (B and C) High-magnification photomicrographs showing the expression of *c-fos* mRNA (silver grains) in all neurons of the locus coeruleus (light grey staining) with (B) naloxone 120 µg/kg as compared to (C) control rats. The small dark grey stained nuclei correspond to glial cells (arrows in C). Scale bars, 500 µm (A), 20 µm (B and C).

163 ± 43 neurons per mm² in control rats; $P < 0.001$) and virtually all neurons exhibited an intense *c-fos* labelling, as shown in Fig. 7.

Cortical and hypothalamic areas, hippocampus and periaqueductal grey

Quantitative analysis has revealed that changes in naloxone-induced *c-fos* mRNA expression in the prelimbic (PIC, Fig. 8A) and cingulate (CgC, Fig. 8B) cortices, as well as in the field CA3 of the hippocampus (CA3, Fig. 8C) were not dose-dependent. Indeed, in the PIC the most significant *c-fos* induction was measured after an injection of naloxone 15 µg/kg ($P < 0.01$ vs. control), whereas levels of *c-fos* mRNA were lower with 30 or 120 µg/kg ($P < 0.05$ vs. control in both case). In CA3, *c-fos* inductions were measured after naloxone 15 and 120 µg/kg ($P < 0.05$ and $P < 0.01$ vs. control, respectively), whereas 7.5 and 30 µg/kg were without effects. In the CgC, only the highest dose of naloxone induced a slight increase in *c-fos* mRNA expression compared to control rats ($P < 0.05$). Also note that the variation pattern of *c-fos* gene expression across naloxone doses was relatively similar for all these latter areas. In contrast, in the field CA1 of the hippocampus (CA1, Fig. 8C), *c-fos* mRNA levels were dose-dependently increased from naloxone 7.5 µg/kg (+71%, $P < 0.05$ vs. control), and reached +280% ($P < 0.001$ vs. control) after 120 µg/kg. The majority of the hippocampal labelled neurons were restricted to the pyramidal layer whereas few labelled neurons were seen in the strata oriens and radiatum.

In the paraventricular hypothalamic nucleus (PVH, Fig. 8D) and PAG (Fig. 8F) an injection of naloxone 30 µg/kg was necessary to elicit an induction of *c-fos* mRNA (+199, $P < 0.01$ and +60%, $P < 0.05$ vs. control, respectively). An increase in *c-fos* expression was also measured in the PVH with 15 µg/kg (+85%); however, this induction did not reach statistical significance vs. control rats. In the PVH and PAG, levels of *c-fos* mRNA expression were further increased after 120 µg/kg (see Fig. 8D and F for significance) to reach +313 and +159%, respectively ($P < 0.001$ vs. control). In contrast, in the lateral hypothalamic area (LHA; Fig. 8E) naloxone 120 µg/kg was required to induce *c-fos* expression (+151%, $P < 0.001$ vs. control).

Discussion

Our study shows that naloxone-precipitated morphine withdrawal is associated with variations of *c-fos* mRNA expression in several brain regions and that the naloxone sensitivity among these areas is strikingly different across doses. We show here that dose-dependent variations of *c-fos* mRNA levels occurred specifically in structures of the limbic system (AcS, LS, BNST, CA1 and amygdala) following the lowest doses of naloxone (7.5 and 15 µg/kg), whereas higher doses of naloxone (30 and 120 µg/kg) were required to induce *c-fos* expression in many other brain areas, including some limbic structures. In addition to the fact that the amygdala was the most sensitive structure, the variation in the pattern of *c-fos* gene expression measured in the main amygdaloid nuclei (CeA and BIA) was opposite after naloxone-precipitated morphine withdrawal. Indeed, the CeA exhibited a strong activation of *c-fos* expression along with increasing doses but, conversely, levels of *c-fos* mRNA were dose-dependently decreased within the BIA. Therefore, the use of a full dose range of opiate antagonist combined with an extensive detection procedure for *c-fos* imaging allowed us to demonstrate the existence of a specific neuronal network which is recruited from very low naloxone doses, and which can be therefore dissociated from a number of other brain areas in which induction of *c-fos* mRNA was detected only with higher doses.

Immediate-early genes such as *c-fos*, *c-jun* or *zif/268* are transiently recruited by various stimuli, and the analysis of their regulation is commonly used as a marker of neuronal reactivity (for reviews: Morgan & Curran, 1995; Herdegen & Leah, 1998; Kovacs, 1998). The detection of *c-fos* gene products using either *in situ* hybridization or immunohistochemistry procedures has been previously used to map the brain sites involved in the acute opiate withdrawal syndrome in response to systemic injections of high doses of opiate antagonists (≥ 100 µg/kg) (Georges *et al.*, 2000; Le Guen *et al.*, 2001). The pattern of *c-fos* gene expression which we observed here with the highest naloxone dose (120 µg/kg) is fully overlapping with the wide range of brain areas recruited in these latter studies. In addition, our *c-fos* mapping reveals that structures such as motor

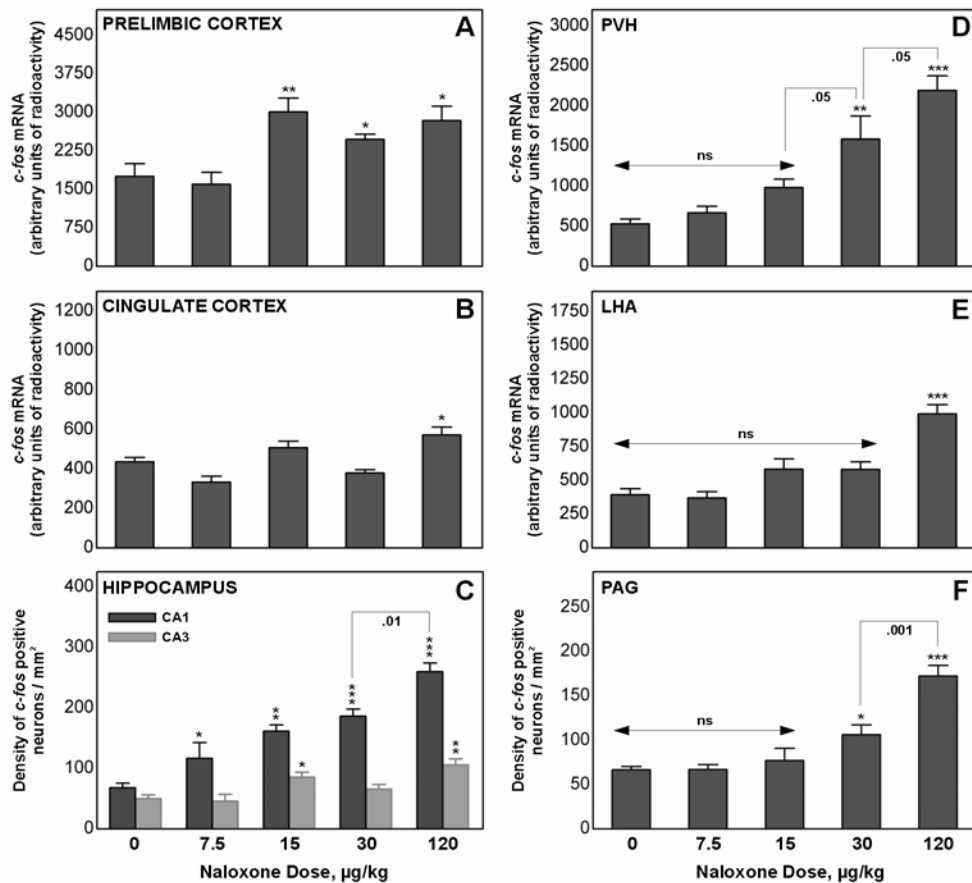


Fig. 8. Quantification of naloxone-induced *c-fos* mRNA expression in cortical and hypothalamic areas, and in the hippocampus and periaqueductal grey of morphine-withdrawn rats. Histograms showing the variations of *c-fos* mRNA expression relative to naloxone doses (0, 7.5, 15, 30 and 120 µg/kg), in (A) the prelimbic and (B) the cingulate cortices, (C) CA1 and CA3, (D) the PVH, (E) the LHA, and (F) the PAG. Depending on the analysis, each bar represents means \pm SEM of (A, B, D and E) the optical density values or (C and F) the number of *c-fos*-positive neurons per mm². High naloxone doses (30 or 120 µg/kg) were required to induce *c-fos* in hypothalamic nuclei and PAG. In cortical areas and CA3, variations of *c-fos* mRNA expression were not related to the doses of naloxone, whereas levels of *c-fos* gene expression were dose-dependently increased in CA1 from naloxone 7.5 µg/kg. An ANOVA was performed for each region [$P < 0.0001$ for CA1 ($F_{4,20} = 21.74$), LHA ($F_{4,23} = 18.47$), PVH ($F_{4,24} = 16.34$), PAG ($F_{4,21} = 18.95$) and CgC ($F_{4,24} = 10.67$); $P = 0.0006$ for PIC ($F_{4,24} = 7.21$); $P = 0.0004$ for CA3 ($F_{4,20} = 8.36$)] followed by *post hoc* Newman–Keuls multiple comparison test: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ vs. control (Nal 0 µg/kg). The significant P -values between naloxone doses are explicitly annotated on graphs (.05, $P < 0.05$; .01, $P < 0.01$; .001, $P < 0.001$).

striatal areas (CPu, AcbC), hypothalamic areas (PVH, LHA), periaqueductal grey and dopaminergic (VTA) and noradrenergic (LC, NTS) nuclei, are recruited only after injections of high doses of naloxone (30 and/or 120 µg/kg). In contrast, we demonstrate here that the AcbS, LS, BNST, CA1 and the amygdala are the only structures which are responsive in terms of *c-fos* mRNA expression to precipitated morphine withdrawal using low doses of naloxone (7.5 and/or 15 µg/kg). A recent imaging study has also assessed the effects of naloxone at doses that produce motivational but not somatic signs of opiate withdrawal (Gracy *et al.*, 2001). Since this latter study was not aimed at specifically comparing the neural correlates of the motivational vs. somatic aspects of withdrawal, only three limbic structures were examined. This work indeed showed that precipitated withdrawal was able to induce Fos protein within the AcbS and the CeA from naloxone 7.5 µg/kg, but did not detect any Fos induction in the BNST using this dose.

Besides, we showed here that, in our experimental conditions, doses of naloxone ranging from 7.5 to 1000 µg/kg were not able to induce conditioned place aversion in placebo rats, which is consistent with earlier studies (Schulteis *et al.*, 1994; Stinus *et al.*, 2000). In contrast, a strong conditioned place aversion was obtained when these

naloxone doses were injected to morphine-dependent rats (see Fig. 2, lower panel). These data indicate that naloxone is not aversive by itself in our experimental conditions, and that its behavioural consequences in morphine-dependent animals are directly related to the state of opiate dependence. Also, the effects of increasing naloxone doses in placebo animals have been previously assessed in other behavioural models (Schulteis *et al.*, 1994), showing that the minimum naloxone dose required to suppress operant responding for food was 1000 µg/kg, and that this same dose was unable to increase intracranial self-stimulation thresholds. Moreover, other studies have previously shown, using either *in situ* hybridization or immunohistochemistry, that only very high doses of opiate antagonists (20 mg/kg for naltrexone, 5000 and 2000 µg/kg for naloxone) were able to increase Fos expression in few brain regions of placebo rats. Specifically, Fos labelling was increased only in the CeA, NTS and supramammillary nucleus, but in a range which was three- to nine-fold lower than the Fos induction obtained with the same doses injected into morphine-dependent rats (Georges *et al.*, 2000; Gestreau *et al.*, 2000; Hamlin *et al.*, 2001; Le Guen *et al.*, 2001). In contrast, lower doses of naloxone close to the doses used in the present study (15, 30 and 1000 µg/kg) injected into placebo rats were unable to

induce Fos expression either in the CeA, AcbS or BNST (Gracy *et al.*, 2001).

Altogether, our results along with the above-mentioned data support the idea that the mapping of *c-fos* mRNA expression induced by increasing naloxone doses in morphine-dependent rats is able to discriminate subsets of structures which are likely to be involved in the motivational vs. somatic components of withdrawal. Our systematic analysis of naloxone-induced *c-fos* expression in a large number of brain areas shows that structures of the extended amygdala (AcbS, BNST and CeA) along with LS, CA1 and BIA might specifically support the motivational component of morphine withdrawal.

Correlation with behavioural studies

Our results are further supported by earlier behavioural studies showing that separate brain sites might be involved in mediating the motivational aspects or the somatic signs of opiate withdrawal (for review: Koob *et al.*, 1992). Indeed, intracerebral microinjections of methylnaloxonium (an opiate antagonist that does not cross the blood–brain barrier) have revealed that the nucleus accumbens and the amygdala were very sensitive in inducing conditioned place aversion (Stinus *et al.*, 1990), whereas the LC and the PAG have been shown to be strongly involved in inducing somatic signs (Maldonado *et al.*, 1992). In addition, when administered intracerebroventricularly, methylnaloxonium was able to produce a withdrawal syndrome fairly similar to systemic naloxone injections although diarrhoea and salivation did not appear, suggesting that these somatic signs might be mediated by peripheral (visceral) withdrawal effects and that the other signs as well as conditioned place aversion might be centrally mediated (Hand *et al.*, 1988; Stinus *et al.*, 1990; Maldonado *et al.*, 1992). Accordingly, the ED₅₀ value analysis of the multiple behavioural indices of morphine withdrawal syndrome (see Fig. 2) emphasize that systemic injections of naloxone doses <20 µg/kg were able to specifically elicit conditioned place aversion and signs related to fear, anxiety and stress, whereas diarrhoea and salivation were sensitive to higher naloxone doses. This behavioural analysis is indeed correlated with our *c-fos* mapping which reveals that many regions of the limbic system are specifically recruited after injections of naloxone doses <20 µg/kg, suggesting that these structures might support the motivational component of morphine withdrawal. Moreover, the variations of *c-fos* gene expression detected in these limbic areas are always further increased across naloxone doses, showing that if these structures are involved in the motivational component of withdrawal their activity also remains strongly altered during the expression of a 'full' withdrawal syndrome induced by high naloxone doses. Accordingly, the clinical symptoms appearing with opiate withdrawal seem to arise with a continuum of temporal pattern including the initial development of a general long-lasting negative affective state (motivational aspects) which is closely followed by the appearance of somatic signs.

Peripheral injections of methylnaloxonium in morphine-dependent rats have been shown to also induce a Fos protein expression within various brain areas (Hamlin *et al.*, 2001). Interestingly, the Fos increase detected in response to peripheral withdrawal (systemic methylnaloxonium, 5 mg/kg) in the CeA, AcbS, VTA, NTS and PVH was less intense than the effect obtained after systemic withdrawal (systemic high naloxone dose, 5 mg/kg), suggesting that part of the induction observed in these areas during systemic morphine withdrawal might be attributable to a specific central effect. Accordingly, peripheral injections of methylnaloxonium failed to induce conditioned place aversion (Hand *et al.*, 1988). We propose therefore that the pattern of *c-fos* mRNA expression specifically detected within the

AcbS, LS, BNST, CA1 and the amygdala with the lowest naloxone doses might exclusively reflect the central processing of the motivational negative affective state associated with the morphine withdrawal syndrome (Hand *et al.*, 1988; Gracy *et al.*, 2001; Hamlin *et al.*, 2001). The further increase in *c-fos* variation measured in these structures as well as the activation detected in other brain areas with higher doses of naloxone could occur as a consequence of the naloxone-induced activation of peripheral sensory afferent pathways (Hamlin *et al.*, 2001).

The AcbS, the BNST and the CeA, in which *c-fos* mRNA expression is induced after precipitated morphine withdrawal using low doses of naloxone, represent the major components of the extended amygdala (Alheid & Heimer, 1988; Heimer *et al.*, 1997a; Heimer *et al.*, 1997b). These limbic subcortical areas are highly interconnected and under modulatory control of ascending dopaminergic and noradrenergic projections originating from the VTA and NTS, respectively (Phelix *et al.*, 1992; Freedman & Cassell, 1994; Delfs *et al.*, 1998; Aston-Jones *et al.*, 1999). Interestingly, the extended amygdala is thought to be involved in drug abuse (Koob & Le Moal, 1997; Rodriguez de Fonseca & Navarro, 1998; Di Chiara *et al.*, 1999), and the intrinsic and extrinsic organization of this macrostructure provides support for its implication in the processing of emotional events (Alheid & Heimer, 1988; Schmued, 1994). We show here that structures of the extended amygdala are specifically recruited during naloxone-precipitated morphine withdrawal using very low doses, which is consistent with the idea that this limbic network might be a key component in the modulation of the motivational properties of opiate withdrawal.

Opposite c-fos variations within the central and basolateral nuclei of the amygdala

The most striking effect of naloxone-precipitated morphine withdrawal was observed in the main amygdaloid nuclei, because we show here opposite dose-dependent variations of *c-fos* expression in the CeA and the BIA during naloxone-precipitated morphine withdrawal. Indeed, whereas the number of *c-fos*-expressing neurons is increased in the CeA, it is conversely decreased in the BIA. These effects were detected from the lowest naloxone dose (7.5 µg/kg) and therefore might relate to the motivational properties of opiate withdrawal. In addition, the induction of *c-fos* mRNA measured in the CeA appears to be mostly restricted to the capsular part, which is highly consistent with the fact that this subdivision shares common properties with the AcbS in terms of connectional and neurochemical architecture (Cassell *et al.*, 1999). Interestingly, the use of highly sensitive *in situ* hybridization allowed us to demonstrate for the first time that morphine withdrawal is able to drive not only inductions but also inhibitions of *c-fos* gene expression, as shown here by the dose-dependent decrease measured in the BIA. This result suggests that the neuronal events in response to various components of opiate withdrawal could also involve inhibitory processes within specific brain areas.

The BIA is a quasi-cortical structure in which GABA interneurons control the activity of excitatory glutamatergic efferent projections connecting GABAergic neurons of the CeA (Pitkanen *et al.*, 1997). Thus, the naloxone-induced *c-fos* mRNA expression measured in the CeA might be a consequence of a loss of inhibitory control over glutamatergic efferents in the BIA. Further investigations are in progress using double *in situ* hybridization procedures for *c-fos* and *GAD* (a marker of GABAergic neurons) mRNAs in order to elucidate the relative contribution of the different subdivisions of the amygdala in the opiate withdrawal syndrome.

The amygdala is a key neural substrate underlying the expression of aversive emotional events (Le Douarin, 2000) and the CeA and BIA have been extensively and differentially involved in associative learning processes attributing affective salience to environmental stimuli paired with drug effects (for review: Everitt *et al.*, 1999). Besides, we have found that the LS and CA1 were also recruited with low doses of naloxone. Interestingly, these structures are interconnected with the amygdala and have also been shown to be involved in emotional conditioning processes (Desmedt *et al.*, 1999; Hall *et al.*, 2000, 2001). Therefore, the opposite *c-fos* expression pattern in the amygdala as well as the activation detected in the other structures of the extended amygdala, the LS and CA1, could reflect the onset of aversive associative learning processes, which are known to mediate naloxone-induced conditioned place aversion.

Functional significance of *c-fos* gene expression

Immediate-early genes are inducible transcription factors whose expression is modified following various stimulations, allowing the use of their regulation as functional markers of neuronal reactivity (for reviews: Morgan & Curran, 1995; Herdegen & Leah, 1998; Kovacs, 1998). However, the causal relationship between *c-fos* expression and the neuronal discharge has not been fully established yet, even though there may be a good correlation in some structures. For instance, it is well known that the electrophysiological activity of LC neurons is increased during morphine withdrawal (Rasmussen *et al.*, 1990) and, accordingly, we show here that all the noradrenergic neurons of the LC were intensely expressing *c-fos* mRNA during naloxone-precipitated morphine withdrawal (see Fig. 7). Conversely, if the activity of dopaminergic neurons is strongly decreased during withdrawal (Diana *et al.*, 1995) along with an increased activity of local GABAergic interneurons (Bonci & Williams, 1997), the relationship with *c-fos* expression has not been clearly demonstrated, probably because the levels of *c-fos* mRNA are extremely low in this area under basal conditions (see also discussion below). To our knowledge, these questions have not been analysed in detail during withdrawal, especially in other brain areas. Nonetheless, in the present study, *c-fos* gene expression was used to map the neuronal pathways whose activity was modified during morphine withdrawal, with no direct extrapolation to an electrophysiological activation or inhibition of these pathways.

Potential mechanisms for *c-fos* expression within structures recruited after precipitated morphine withdrawal using low naloxone doses

Opioid receptors are negatively coupled to adenylate cyclase via $G_{i/o}$ proteins (for reviews: Mansour *et al.*, 1995; Law & Loh, 1999) and can be located pre- and/or postsynaptically. The central blockade of these receptors induced by naloxone can lead both to a facilitation of presynaptic transmission and to a disinhibition of postsynaptic neurons (Duggan & North, 1983), and consequently might result in both cases in an increase of *c-fos* gene expression. Moreover, at the doses used in our study, naloxone binds preferentially to the μ -opioid receptor subtype (Law & Loh, 1999). Thus, naloxone-induced *c-fos* mRNA expression might be preferentially detected in structures containing high densities of μ -opioid receptors. However, the distribution of μ -opioid receptors in the rat brain (Mansour *et al.*, 1995) can only partially account for this hypothesis. For instance, very few opioid receptors were described in the CeA (Mansour *et al.*, 1995) which is, however, the structure most responsive to naloxone injections in our experimental conditions. Nevertheless, the variation in *c-fos* gene expression in a given brain structure during naloxone-

precipitated morphine withdrawal cannot be strictly related to its content of μ -opioid receptor binding sites.

Other mechanisms could involve interactive processes between noradrenaline and dopamine within the extended amygdala which have been proposed as mediating the motivational properties of opiate withdrawal (Pothos *et al.*, 1991; Delfs *et al.*, 2000). Increasing evidence supports the hypothesis that LC noradrenergic neurons could not be involved in the aversive component of withdrawal (Caillé *et al.*, 1999; Delfs *et al.*, 2000). Therefore, naloxone-induced *c-fos* gene expression in structures of the extended amygdala using low doses could be driven by the activity of the dopaminergic and noradrenergic afferents arising from the VTA and NTS, respectively. Accordingly, the noradrenergic projections arising from the A2 cell group of the NTS are strongly recruited during morphine withdrawal (Harris & Aston-Jones, 1993; Aston-Jones *et al.*, 1999; Delfs *et al.*, 2000). In addition, a profound decrease in the mesolimbic dopaminergic neuronal activity has been found in morphine-withdrawn rats (Diana *et al.*, 1995), along with a reduction in the extracellular levels of dopamine in the nucleus accumbens (Pothos *et al.*, 1991; Acquas & Di Chiara, 1992; Rossetti *et al.*, 1992). Although all these data were obtained with high doses of opiate antagonists, behavioural analyses have suggested that the activity of monoaminergic afferents should be involved preferentially in the motivational component of withdrawal (Crippens & Robinson, 1994; Diana *et al.*, 1999; Delfs *et al.*, 2000). However, we were unable to detect noticeable changes in *c-fos* expression within the VTA or NTS after naloxone-precipitated withdrawal using the lowest doses, despite a slight tendency to increase with 15 μ g/kg in both cases. These apparently contradictory data deserve further analysis within these structures, and we cannot currently exclude a possible participation of these monoaminergic pathways in the motivational properties of opiate withdrawal. Indeed, if the dopaminergic and noradrenergic neurons are responsible for the changes that we observe in the extended amygdala 1 h after naloxone injections, it is possible that variations in *c-fos* gene expression could occur more rapidly within the VTA and NTS. Furthermore, a recent study has shown that the transcription mediated by the cAMP response element was down-regulated preferentially in the dopaminergic neurons of the VTA during naltrexone-precipitated morphine withdrawal, whereas the Fos protein expression was increased in the nondopaminergic cells (Shaw-Lutchman *et al.*, 2002), suggesting that VTA dopaminergic neurons may be inhibited during withdrawal by an increase in GABAergic transmission by local interneurons (Bonci & Williams, 1997; Shaw-Lutchman *et al.*, 2002). Accordingly, we show here an increase of *c-fos* mRNA expression within the VTA (which may therefore preferentially concern local interneurons) after naloxone 15, 30 and 120 μ g/kg, but other experiments, including phenotypical characterization of the VTA cell types that display *c-fos* labelling, as well as the use of different markers (e.g. other immediate-early genes or MAP kinases), will be needed to go further into these questions. If we assume that *c-fos* gene expression would be able to reflect the opposite changes of the neuronal activity of the two VTA cell types, which appears to be critical in mediating the aversive properties of withdrawal (Crippens & Robinson, 1994; Diana *et al.*, 1999), the increase in *c-fos* mRNA expression within GABAergic interneurons could be masked by a resulting decrease occurring in the mesolimbic dopaminergic neurons when using the lowest doses of naloxone.

Finally, structures of the extended amygdala have been extensively reported as a locus of several cellular and molecular neuroadaptations occurring during drug dependence and withdrawal, and are able to directly influence either the opioidergic system and/or other neurotransmitter systems (for reviews: Koob & Le Moal, 1997;

Nestler & Aghajanian, 1997; Williams *et al.*, 2001). These adaptive neurochemical events have been linked to the long-lasting motivational aspects of opiate withdrawal and might also contribute to the specific pattern of *c-fos* gene expression within these structures, leading the system to a state highly sensitive to naloxone.

Conclusion

In conclusion, our data demonstrate that naloxone-precipitated morphine withdrawal using low doses is able to modify *c-fos* gene expression within a specific interconnected limbic network including the extended amygdala (AcbS, BNST and CeA), the LS, CA1 and the BIA. We propose therefore that this specific expression pattern might reveal the central processing of the motivational properties of opiate withdrawal. In contrast, systemic injections of higher naloxone doses into morphine-dependent rats are necessary to recruit many other brain areas, which consequently might be preferentially involved in the expression of the overt somatic signs appearing with the morphine withdrawal syndrome. The parallel between the naloxone dose-response analysis of the multiple behavioural indices of morphine withdrawal and the expression pattern of naloxone-induced *c-fos* gene expression contributes to better delineate the brain areas which underlie the expression of the different symptoms of morphine withdrawal.

Acknowledgements

This work was supported by the MILDT (Mission Inter-ministérielle de Lutte contre la Drogue et la Toxicomanie), the FRM (Fondation pour la Recherche Médicale) and the Région Aquitaine. The authors thank Lydie Gouttière and Muriel Manse for excellent technical assistance, and Bertrand Bloch, François Gonon and François Georges for constant support and critical reading of the manuscript.

Abbreviations

AcbC, accumbens nucleus core part; AcbS, accumbens nucleus shell part; BIA, basolateral nucleus of the amygdala; BNSTd, bed nucleus of the stria terminalis dorsal part; BNSTv, bed nucleus of the stria terminalis ventral part; CA1, field CA1 of the hippocampus; CA3, field CA3 of the hippocampus; CeA, central nucleus of the amygdala; CgC, cingulate cortex; CPu, caudate-putamen; GABA, γ -aminobutyric acid; LC, locus coeruleus; LHA, lateral hypothalamic area; LS, lateral septal nucleus; Nal, naloxone; NTS, nucleus of the solitary tract; PAG, periaqueductal grey; PIC, prelimbic cortex; PVH, paraventricular hypothalamic nucleus; SSC, sodium chloride sodium citrate buffer; VTA, ventral tegmental area.

References

Acquas, E. & Di Chiara, G. (1992) Depression of mesolimbic dopamine transmission and sensitization to morphine during opiate abstinence. *J. Neurochem.*, **58**, 1620–1625.

Aghajanian, G.K. (1978) Tolerance of locus coeruleus neurons to morphine and suppression of withdrawal response by clonidine. *Nature*, **276**, 186–188.

Alheid, G.F. & Heimer, L. (1988) New perspectives in basal forebrain organization of special relevance for neuropsychiatric disorders: the striatopallidum, amygdaloid, and corticopetal components of substantia innominata. *Neuroscience*, **27**, 1–39.

Aston-Jones, G., Delfs, J.M., Druhan, J. & Zhu, Y. (1999) The bed nucleus of the stria terminalis. A target site for noradrenergic actions in opiate withdrawal. *Ann. NY Acad. Sci.*, **877**, 486–498.

Bechara, A., Nader, K. & van der Kooy, D. (1998) A two-separate-motivational-systems hypothesis of opioid addiction. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **59**, 1–17.

Bonci, A. & Williams, J.T. (1997) Increased probability of GABA release during withdrawal from morphine. *J. Neurosci.*, **17**, 796–803.

Bozarth, M.A. & Wise, R.A. (1984) Anatomically distinct opiate receptor fields mediate reward and physical dependence. *Science*, **224**, 516–517.

Caillé, S., Espejo, E.F., Reneric, J.P., Cador, M., Koob, G.F. & Stinus, L. (1999) Total neurochemical lesion of noradrenergic neurons of the locus coeruleus does not alter either naloxone-precipitated or spontaneous opiate withdrawal nor does it influence ability of clonidine to reverse opiate withdrawal. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **290**, 881–892.

Cassell, M.D., Freedman, L.J. & Shi, C. (1999) The intrinsic organization of the central extended amygdala. *Ann. NY Acad. Sci.*, **877**, 217–241.

Crippens, D. & Robinson, T.E. (1994) Withdrawal from morphine or amphetamine: different effects on dopamine in the ventral-medial striatum studied with microdialysis. *Brain Res.*, **650**, 56–62.

Curran, T., Gordon, M.B., Rubino, K.L. & Sambucetti, L.C. (1987) Isolation and characterization of the *c-fos* (rat) cDNA and analysis of post-translational modification in vitro. *Oncogene*, **2**, 79–84.

Delfs, J.M., Zhu, Y., Druhan, J.P. & Aston-Jones, G.S. (1998) Origin of noradrenergic afferents to the shell subregion of the nucleus accumbens: anterograde and retrograde tract-tracing studies in the rat. *Brain Res.*, **806**, 127–140.

Delfs, J.M., Zhu, Y., Druhan, J.P. & Aston-Jones, G. (2000) Noradrenaline in the ventral forebrain is critical for opiate withdrawal-induced aversion. *Nature*, **403**, 430–434.

Desmedt, A., Garcia, R. & Jaffard, R. (1999) Vasopressin in the lateral septum promotes elemental conditioning to the detriment of contextual fear conditioning in mice. *Eur. J. Neurosci.*, **11**, 3913–3921.

Di Chiara, G., Tanda, G., Bassareo, V., Pontieri, F., Acquas, E., Fenu, S., Cadoni, C. & Carboni, E. (1999) Drug addiction as a disorder of associative learning. Role of nucleus accumbens shell/extended amygdala dopamine. *Ann. NY Acad. Sci.*, **877**, 461–485.

Diana, M., Muntoni, A.L., Pistis, M., Melis, M. & Gessa, G.L. (1999) Lasting reduction in mesolimbic dopamine neuronal activity after morphine withdrawal. *Eur. J. Neurosci.*, **11**, 1037–1041.

Diana, M., Pistis, M., Muntoni, A. & Gessa, G. (1995) Profound decrease of mesolimbic dopaminergic neuronal activity in morphine withdrawn rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **272**, 781–785.

Duggan, A.W. & North, R.A. (1983) Electrophysiology of opioids. *Pharmacol. Rev.*, **35**, 219–281.

Espejo, E.F., Cador, M. & Stinus, L. (1995) Ethopharmacological analysis of naloxone-precipitated morphine withdrawal syndrome in rats: a newly-developed 'etho-score'. *Psychopharmacology (Berl.)*, **122**, 122–130.

Everitt, B.J., Parkinson, J.A., Olmstead, M.C., Arroyo, M., Robledo, P. & Robbins, T.W. (1999) Associative processes in addiction and reward. The role of amygdala-ventral striatal subsystems. *Ann. NY Acad. Sci.*, **877**, 412–438.

Freedman, L.J. & Cassell, M.D. (1994) Distribution of dopaminergic fibers in the central division of the extended amygdala of the rat. *Brain Res.*, **633**, 243–252.

Gellert, V.F. & Holtzman, S.G. (1978) Development and maintenance of morphine tolerance and dependence in the rat by scheduled access to morphine drinking solutions. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **205**, 536–546.

Georges, F., Stinus, L. & Le Moine, C. (2000) Mapping of *c-fos* gene expression in the brain during morphine dependence and precipitated withdrawal, and phenotypic identification of the striatal neurons involved. *Eur. J. Neurosci.*, **12**, 4475–4486.

Gestreau, C., Le Guen, S. & Besson, J.M. (2000) Is there tonic activity in the endogenous opioid systems? A c-Fos study in the rat central nervous system after intravenous injection of naloxone or naloxone-methiodide. *J. Comp. Neurol.*, **427**, 285–301.

Gold, L.H., Stinus, L., Inturrisi, C.E. & Koob, G.F. (1994) Prolonged tolerance, dependence and abstinence following subcutaneous morphine pellet implantation in the rat. *Eur. J. Pharmacol.*, **253**, 45–51.

Gracy, K.N., Dankiewicz, L.A. & Koob, G.F. (2001) Opiate withdrawal-induced fos immunoreactivity in the rat extended amygdala parallels the development of conditioned place aversion. *Neuropsychopharmacology*, **24**, 152–160.

Hall, J., Thomas, K.L. & Everitt, B.J. (2000) Rapid and selective induction of BDNF expression in the hippocampus during contextual learning. *Nature Neurosci.*, **3**, 533–535.

Hall, J., Thomas, K.L. & Everitt, B.J. (2001) Cellular imaging of zif268 expression in the hippocampus and amygdala during contextual and cued fear memory retrieval: selective activation of hippocampal CA1 neurons during the recall of contextual memories. *J. Neurosci.*, **21**, 2186–2193.

Hamlin, A., Buller, K.M., Day, T.A. & Osborne, P.B. (2001) Peripheral withdrawal recruits distinct central nuclei in morphine-dependent rats. *Neuropharmacology*, **41**, 574–581.

- Hand, T.H., Koob, G.F., Stinus, L. & Le Moal, M. (1988) Aversive properties of opiate receptor blockade: evidence for exclusively central mediation in naive and morphine-dependent rats. *Brain Res.*, **474**, 364–368.
- Harlan, R.E. & Garcia, M.M. (1998) Drugs of abuse and immediate-early genes in the forebrain. *Mol. Neurobiol.*, **16**, 221–267.
- Harris, G.C. & Aston-Jones, G. (1993) Beta-adrenergic antagonists attenuate somatic and aversive signs of opiate withdrawal. *Neuropsychopharmacology*, **9**, 303–311.
- Harris, G.C. & Aston-Jones, G. (1994) Involvement of D2 dopamine receptors in the nucleus accumbens in the opiate withdrawal syndrome. *Nature*, **371**, 155–157.
- Heimer, L., Alheid, G.F., de Olmos, J.S., Groenewegen, H.J., Haber, S.N., Harlan, R.E. & Zahm, D.S. (1997a) The accumbens: beyond the core-shell dichotomy. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.*, **9**, 354–381.
- Heimer, L., Harlan, R.E., Alheid, G.F., Garcia, M.M. & de Olmos, J. (1997b) Substantia innominata: a notion which impedes clinical-anatomical correlations in neuropsychiatric disorders. *Neuroscience*, **76**, 957–1006.
- Heinrichs, S., Menzaghi, F., Schulteis, G., Koob, G.F. & Stinus, L. (1995) Suppression of corticotropin-releasing factor in the amygdala attenuates aversive consequences of morphine withdrawal. *Behav. Pharmacol.*, **6**, 74–80.
- Herdegen, T. & Leah, J.D. (1998) Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Res. Rev.*, **28**, 370–490.
- Higgins, G.A. & Sellers, E.M. (1994) Antagonist-precipitated opioid withdrawal in rats: evidence for dissociations between physical and motivational signs. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **48**, 1–8.
- Koob, G.F. (1996) Drug addiction: the yin and yang of hedonic homeostasis. *Neuron*, **16**, 893–896.
- Koob, G.F. & Le Moal, M. (1997) Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science*, **278**, 52–58.
- Koob, G.F., Maldonado, R. & Stinus, L. (1992) Neural substrates of opiate withdrawal. *Trends Neurosci.*, **15**, 186–191.
- Kovacs, K.J. (1998) c-Fos as a transcription factor: a stressful (re) view from a functional map. *Neurochem. Int.*, **33**, 287–297.
- Law, P.Y. & Loh, H.H. (1999) Regulation of opioid receptor activities. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **289**, 607–624.
- Le Doux, J.E. (2000) Emotion circuits in the brain. *Annu. Rev. Neurosci.*, **23**, 155–184.
- Le Guen, S., Gestreau, C. & Besson, J.M. (2001) Sensitivity to naloxone of the behavioral signs of morphine withdrawal and c-Fos expression in the rat CNS: a quantitative dose–response analysis. *J. Comp. Neurol.*, **433**, 272–296.
- Le Moine, C. (2000) Quantitative in situ hybridization using radioactive probes to study gene expression in heterocellular systems. *Meth. Mol. Biol.*, **123**, 143–156.
- Le Moine, C., Svenningsson, P., Fredholm, B.B. & Bloch, B. (1997) Dopamine–adenosine interactions in the striatum and the globus pallidus: inhibition of striatopallidal neurons through either D2 or A2A receptors enhances D1 receptor-mediated effects on c-fos expression. *J. Neurosci.*, **17**, 8038–8048.
- Maldonado, R. (1997) Participation of noradrenergic pathways in the expression of opiate withdrawal: biochemical and pharmacological evidence. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **21**, 91–104.
- Maldonado, R., Stinus, L., Gold, L.H. & Koob, G.F. (1992) Role of different brain structures in the expression of the physical morphine withdrawal syndrome. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **261**, 669–677.
- Mansour, A., Fox, C.A., Akil, H. & Watson, S.J. (1995) Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends Neurosci.*, **18**, 22–29.
- Morgan, J.I. & Curran, T. (1995) Immediate-early genes: ten years on. *Trends Neurosci.*, **18**, 66–67.
- Mucha, R.F. (1987) Is the motivational effect of opiate withdrawal reflected by common somatic indices of precipitated withdrawal? A place conditioning study in the rat. *Brain Res.*, **418**, 214–220.
- Nestler, E.J. & Aghajanian, G.K. (1997) Molecular and cellular basis of addiction. *Science*, **278**, 58–63.
- Paxinos, G. & Watson, C. (1997) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, San Diego.
- Phelix, C.F., Liposits, Z. & Paull, W.K. (1992) Monoamine innervation of bed nucleus of stria terminalis: an electron microscopic investigation. *Brain Res. Bull.*, **28**, 949–965.
- Pitkanen, A., Savander, V. & Le Doux, J.E. (1997) Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends Neurosci.*, **20**, 517–523.
- Pothos, E., Rada, P., Mark, G.P. & Hoebel, B.G. (1991) Dopamine microdialysis in the nucleus accumbens during acute and chronic morphine, naloxone-precipitated withdrawal and clonidine treatment. *Brain Res.*, **566**, 348–350.
- Rasmussen, K., Beitner-Johnson, D.B., Krystal, J.H., Aghajanian, G.K. & Nestler, E.J. (1990) Opiate withdrawal and the rat locus coeruleus: behavioral, electrophysiological, and biochemical correlates. *J. Neurosci.*, **10**, 2308–2317.
- Rodriguez de Fonseca, F. & Navarro, M. (1998) Role of the limbic system in dependence on drugs. *Ann. Med.*, **30**, 397–405.
- Rossetti, Z.L., Hmaidan, Y. & Gessa, G.L. (1992) Marked inhibition of mesolimbic dopamine release: a common feature of ethanol, morphine, cocaine and amphetamine abstinence in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **221**, 227–234.
- Schmued, L.C. (1994) Diagonal ventral forebrain continuum has overlapping telencephalic inputs and brainstem outputs which may represent loci for limbic/autonomic integration. *Brain Res.*, **667**, 175–191.
- Schulteis, G., Markou, A., Gold, L.H., Stinus, L. & Koob, G.F. (1994) Relative sensitivity to naloxone of multiple indices of opiate withdrawal: a quantitative dose–response analysis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **271**, 1391–1398.
- Shaw-Lutchman, T.Z., Barrot, M., Wallace, T., Gilden, L., Zachariou, V., Impey, S., Duman, R.S., Storm, D. & Nestler, E.J. (2002) Regional and cellular mapping of cAMP response element-mediated transcription during naltrexone-precipitated morphine withdrawal. *J. Neurosci.*, **22**, 3663–3672.
- Stinus, L., Caillé, S. & Koob, G.F. (2000) Opiate withdrawal-induced place aversion lasts for up to 16 weeks. *Psychopharmacology*, **149**, 115–120.
- Stinus, L., Le Moal, M. & Koob, G.F. (1990) Nucleus accumbens and amygdala are possible substrates for the aversive stimulus effects of opiate withdrawal. *Neuroscience*, **37**, 767–773.
- Walters, C.L., Aston-Jones, G. & Druhan, J.P. (2000) Expression of fos-related antigens in the nucleus accumbens during opiate withdrawal and their attenuation by a D2 dopamine receptor agonist. *Neuropsychopharmacology*, **23**, 307–315.
- Williams, J.T., Christie, M.J. & Manzoni, O. (2001) Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. *Physiol. Rev.*, **81**, 299–343.

RÉSUMÉ

L'addiction correspond à un désordre psychobiologique caractérisé par une tendance chronique à la rechute, et implique des processus d'ordre motivationnels et émotionnels qui mettent en jeu des phénomènes d'apprentissage et de mémoire affective. Chez le toxicomane abstinent, la présentation de situations environnementales précédemment associées à l'expérience du sevrage des opiacés est capable d'induire un intense désir pour la drogue (« *craving* »), et il a été proposé que ces stimuli conditionnés pourraient précipiter la rechute en réactivant les circuits neuronaux qui sont mis en jeu de manière inconditionnée par le sevrage. Dans ce contexte, nous avons entrepris la caractérisation de la composante motivationnelle du sevrage des opiacés en utilisant des modèles comportementaux (sevrage précipité par des faibles doses de naloxone chez le rat morphino-dépendant, réexposition à des stimuli environnementaux précédemment associés au sevrage dans un modèle d'aversion de place conditionnée) qui permettent d'évaluer les propriétés aversives et motivationnelles du sevrage, aussi bien sur le versant inconditionné que conditionné. Nous avons ainsi recherché les substrats neurobiologiques impliqués dans ces phénomènes en « traçant » de manière extensive les circuits neuronaux recrutés, en terme de localisation et de populations neuronales, par une approche de neuroanatomie fonctionnelle utilisant la détection du marqueur de réactivité neuronale *c-fos* par hybridation *in situ*.

D'une manière générale, nos résultats montrent que les substrats neuronaux sous-jacents à la composante motivationnelle du sevrage – qui incluent en particulier les structures de l'« *extended amygdala* » (noyau accumbens partie médiale shell, noyau du lit de la strie terminale et noyau central de l'amygdale) et les régions limbiques qui lui sont associées (noyau basolatéral de l'amygdale, hippocampe, septum latéral et aire tegmentale ventrale) – peuvent être dissociés d'un ensemble d'autres régions cérébrales qui sont en revanche impliquées dans l'expression de la symptomatologie somatique du sevrage.

Au niveau de l'aire tegmentale ventrale (VTA), notre analyse phénotypique des neurones recrutés au cours du sevrage précipité par la naloxone (situation inconditionnée) et lors de la présentation de stimuli environnementaux associés au sevrage (situation conditionnée) montre une induction massive dans la population des interneurons GABAergiques. Bien qu'une telle activité GABAergique est supposée être capable d'inhiber en grande partie les neurones dopaminergiques, nous montrons également qu'une sous-population de neurones dopaminergiques de la VTA (environ 15%) est activée dans ces deux situations.

Au niveau de l'amygdale, nos résultats montrent l'existence d'une double dissociation anatomique et fonctionnelle dans la réponse globale des noyaux central (CeA) et basolatéral (BIA) en terme d'expression de *c-fos* entre les situations inconditionnée et conditionnée. Dans le BIA, bien que le sevrage précipité par la naloxone induise une diminution de l'activité de la majorité des neurones efférents glutamatergiques, une sous-population de ces neurones montre une intense induction de l'ARNm *c-fos*. La réexposition aux stimuli conditionnés au sevrage provoque quant à elle une intense activation dans de nombreux neurones glutamatergiques du BIA. Dans les neurones GABAergiques du CeA, les réponses *c-fos* sont opposées aux réponses globales du BIA, puisque l'expression de *c-fos* dans ces neurones est augmentée dans la situation inconditionnée, alors qu'elle est diminuée dans la situation conditionnée.

Nous proposons que le pattern d'expression de *c-fos* que nous détectons dans l'ensemble de ces structures limbiques pourrait refléter ① la mise en place de processus d'apprentissage associatif permettant d'encoder la valeur affective et motivationnelle des stimuli environnementaux associés au sevrage de la morphine, dans la situation inconditionnée, et ② le rappel et l'expression des associations mémorisées au cours du conditionnement, dans la situation conditionnée (« mémoire du sevrage »). Ainsi, sur la base de l'ensemble de nos résultats et de nombreuses données de la littérature, nous proposons un modèle fonctionnel pour la formation et le rappel de la « mémoire du sevrage des opiacés ».



Discipline : Neurosciences & Pharmacologie

Mots-clés : rat, comportement, apprentissage et mémoire, aversion de place conditionnée, sevrage de la morphine, hybridation *in situ*, cartographie *c-fos*, « *extended amygdala* », aire tegmentale ventrale (dopamine), noyaux central et basolatéral de l'amygdale.

