



HAL
open science

Étude de l'implication des voies liées à la neuroinflammation dans le comportement d'auto-administration de cocaïne chez le rat

Caroline Correia

► **To cite this version:**

Caroline Correia. Étude de l'implication des voies liées à la neuroinflammation dans le comportement d'auto-administration de cocaïne chez le rat. Médecine humaine et pathologie. Université de Strasbourg, 2021. Français. NNT : 2021STRAJ092 . tel-03719262

HAL Id: tel-03719262

<https://theses.hal.science/tel-03719262>

Submitted on 11 Jul 2022

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

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

Université de Strasbourg

École doctorale des sciences de la vie et de la santé

Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives (UMR 7364)

Thèse présentée par :

Caroline CORREIA

Soutenue le : 12 mars 2021

Pour obtenir de grade de : Docteur de l'université de Strasbourg

Spécialité : Neurosciences

Etudes de l'implication des voies liées à la neuroinflammation dans le comportement d'auto-administration de cocaïne chez le rat

Thèse dirigée par :

Mme Katia Befort

Chargée de recherche CNRS, Université de Strasbourg

Rapporteurs :

M. Marcello Solinas

Directeur de recherche CNRS, Université de Poitiers

Mme Lauriane Ulmann

Maitre de conférences, Université de Montpellier

Examinatrice :

Mme Monique Majchrzak

Professeure, Université de Strasbourg

Co-encadrant de thèse :

M. Pascal Romieu

Maitre de conférences, Université de Strasbourg

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier les docteurs Marcello Solinas, Lauriane Ulmann et Monique Majchrzak d'avoir acceptés d'évaluer mon travail de thèse.

Je tiens ensuite à remercier le Pr. Jean-Christophe Cassel de m'avoir accueillie au sein du laboratoire.

Je souhaite également remercier les docteurs Katia Befort et Pascal Romieu de m'avoir accueillie dans l'équipe, de m'avoir encadrée et formée à la recherche.

Tout d'abord, Katia merci de m'avoir acceptée dans l'équipe et de m'avoir fait confiance pour me confier ce projet sans connaître mes capacités de travail, ni mon acceptation des rats, hahaha. Merci pour ton écoute et ta gentillesse. D'avoir pris le temps de parler de mon projet et des démarches à suivre pour le mener à bien. Merci de m'avoir appris à rédiger des revues et articles scientifiques.

Pascal, tu n'étais pas officiellement mon directeur de thèse mais tu as quand même porté ce projet avec moi tout du long. Merci de m'avoir appris à maîtriser l'auto-administration et la chirurgie (ce n'était pas gagné !). Merci pour tout l'enseignement que tu m'as apporté d'un point de vue théorique et pratique. Tu es clairement fait pour être prof ! Merci pour toutes les discussions autour du projet et sur comment interpréter les résultats qui nous ont parfois surpris. Aussi, merci de m'avoir quand même supportée jusqu'au bout, pour ta patience et ton humour.

A vous deux merci de m'avoir laissée amener le projet dans les directions que je voulais, cela m'a permis d'étudier la dépendance et la mémoire, les deux thématiques qui m'ont toujours intéressée.

Ensuite, je tiens à remercier tous les autres membres de l'équipe présents et passés Romain, Gaëlle, David, Laurie-Anne, Florian, Anne-Sophie et Cécile. Merci à tous pour votre aide, enseignement et bons moments (on est quand même l'équipe la plus cool du Labo ☺).

Je tiens aussi à remercier les autres membres du labo et notamment Karine Herbeaux, le labo ne serait rien sans toi. Ta bonne humeur et ton professionnalisme m'impressionnent toujours. I also want to thank Isabel and Rafael, You both for your kindness and professionalism. I owe you a lot for all the times you help me with the questions about the molecular experiments. Além disso, Isabel, obrigada pela prática e por me ajudar a matar as saudades.

Je tiens particulièrement à remercier ceux sans qui je n'aurai certainement pas fini ces 3 années et demie. Les autres doctorants et compagnies que je suis heureuse

d'appeler mes amis. Gaëlle, Laura T, Laura D, Chris et Marion mais aussi Théo, Yann, Julie, Patrick et Elina. Toutes ces soirées, danses, jeux, escapades et autres activités auront été un souffle de vie indispensable et un soutien indéniable qui m'auront fait tenir. J'en garde des souvenirs merveilleux et j'espère que beaucoup viendront encore, vous ne vous débarrasserez plus jamais de moi ☺ !

Enfin, je tiens à remercier mes amies de toujours. J'ai certainement peu de qualités mais savoir choisir mes amies en fait clairement partie. Merci Mélissa, Pauline, Sihem, Christina, Selma, Cindy, Fanny, Juliette, Eléonore et bien sûr Charlène. Je vous ai toutes connues à des moments différents de ma vie mais chacune à votre manière vous avez contribué à qui je suis aujourd'hui. Merci pour votre soutien sans failles toutes ces années. Bien que la distance nous sépare aujourd'hui vous avez toujours été présentes <3.

Pour terminer, ceux sans qui je n'existerais pas, mes parents, ma sœur, nièce/neveu, cousines/cousins et tantes. Vous êtes bien placés pour savoir que je ne suis pas du genre émotions et sentiments, alors profitez de ces quelques mots rares. Merci à tous de m'avoir soutenue et supportée ces dernières années, et cela même si vous ne compreniez pas vraiment pourquoi tout ça. Vous êtes sans aucun doute ceux qui ont le plus ressenti les répercussions de la thèse et j'en suis désolée. Merci d'avoir accepté mes sauts d'humeur et mon absence. Merci d'avoir toujours été là et de m'avoir soutenue pendant toutes ces années d'études et même si vous vous demandez encore quand est-ce que j'arrêterais enfin d'étudier... bientôt promis. Merci de m'avoir inculqué les bonnes valeurs, celles de la famille, de l'humilité, de l'honnêteté et du travail. Vous avez toujours été un exemple pour moi, je suis fière de vous ☺. Aujourd'hui je suis peut-être la première de la famille à avoir fait des études mais je ne serais pas la dernière... les petits princes, un jour deviendront grand, Lilly et Tiago <3.

Ps : Merci à ceux sans qui aucun résultat n'aurait été obtenu... les petits pères. Et bonus pour Coco, Nougat, Noddle et Pancake, mes loulous vous êtes ma rédemption.

PhD Portfolio

EDUCATION

- Oct 17 – Jan 21** **Doctorante – Laboratoire de neurosciences cognitives et adaptatives (LNCA)** Equipe: “Abus de Drogues et Neuroadaptations”
Strasbourg, France. Supervision: Katia Befort/Pascal Romieu
Implication des voies liées à la neuroinflammation dans le comportement d’auto-administration de cocaïne chez le Rat
- Sept 15 – Juin 17** **Master – Science de la vie – Neurosciences et signalisation cellulaire**
Université Paris Saclay, Orsay, France
- Sept 14 – Juin 17** **Magistère de biologie d’Orsay**
Université Paris Saclay, Orsay, France
- Sept 12 – Juin 15** **Licence – Science de la vie**
Université Paris Sud, Orsay, France

EXPERIENCES

- Jan – Mars 19** **Stage** au Centre for Neuroscience Studies,
Queen's University, Kingston, Canada. Supervision : Mary C. Olmstead
Discussion scientifique, écriture d’une revue et rencontres – Cours de statistiques (logiciel R)
- Jan – Juin 17** **Stage** à l’Institut Pasteur
Paris, France. Supervision: Morgane Besson
Implication de la sous-unité $\alpha 5$ nACh dans la dépendance à la cocaïne et à l’alcool chez le Rat
- Juin – Août 16** **Stage** à l’institut de biologie intégrative de la cellule (i2bc)
Orsay, France. Supervision : Sylvie Lautru
Mise en place d’un outil moléculaire permettant la modulation de la conformation de l’ADN en utilisant CRISPR-Cas9 – Dans le cadre du concours scientifique étudiants IGEM (International Genetically Engineered Machine) organisé par le MIT de Boston, USA
- Juin – Août 15** **Stage** à l’Unité de Neurosciences, Information et Complexité (Unic)
Gif-sur-Yvette, France. Supervision : Valérie Ego-Stengel
Mise en place d’une tâche de discrimination tactile chez le Rat

PUBLICATIONS

Morgane Besson, Benoît Forget, [Caroline Correia](#), Rodolphe Blanco, Uwe Maskos. **Profound alteration in reward processing due to a human polymorphism in CHRNA5: a role in alcohol dependence and feeding behavior.** *Neuropsychopharmacology*. 2019 Oct;44(11):1906-1916.
doi: 10.1038/s41386-019-0462-0

Benoît Forget, Romain Icick, Jonathan Robert, [Caroline Correia](#), Marie S. Prevost, Marc Gielen, Pierre-Jean Corringer, Frank Bellivier, Florence Vorspan, Morgane Besson, Uwe Maskos. **Alterations in nicotinic receptor alpha5 subunit gene differentially impact early and later stages of cocaine addiction: a translational study in transgenic rats and patients.** *Prog Neurobiol*. 2020 Aug 22;101898. doi: 10.1016/j.pneurobio.2020.101898

[Caroline Correia](#), Pascal Romieu, Mary C. Olmstead, Katia Befort. **Can cocaine-induced neuroinflammation explain maladaptive cocaine-associated memories?** *Neurosciences and behavioral reviews* 2020 Apr;111:69-83. doi: 10.1016/j.neubiorev.2020.01.001

Caroline Correia, Katia Befort, Pascal Romieu. **Andrographolide, an NFκB inhibitor, increases voluntary cocaine intake and motivation for the drug in rats.** Soumis

CONFERENCES et PRESENTATIONS

Neuropôle day 2020

Janvier 2020, Strasbourg, France

Oral : Involvement of nfkb in cocaine-associated reconsolidation using intravenous self-administration. Caroline Correia, Mary C. Olmstead, Katia Befort, Pascal Romieu

IDARS (International Drug Abuse Research Society) 2019

Septembre 2019, Casablanca, Morocco

Oral et poster: Involvement of nfkb in cocaine-associated reconsolidation using intravenous self-administration. Caroline Correia, Mary C. Olmstead, Katia Befort, Pascal Romieu.

NeuroFrance 2019

May 2019, Marseille, France

Poster : Effect of NFκB inhibitors on reconsolidation of memories associated with cocaine self-administration. Caroline Correia, Mary C. Olmstead, Katia Befort, Pascal Romieu.

FORMATIONS

Formation relative à l'expérimentation animale

Chirurgie des rongeurs

Outils en ligne pour cartographier ou présenter visuellement les données

MOOC « intégrité scientifique dans les métiers de la recherche »

Zotéro initiation

Communiquer sur sa recherche : communiqué de presse, interviews

Charte de déontologie des métiers de la recherche

Participation à la fête de la science 2018 et 2019

Introduction to multivariate and multivariable statistics

ENSEIGNEMENT ET ENCADREMENT D'ETUDIANTS

Oct 17 – Sept 19 Mission d'enseignement

Faculté de psychologie de Strasbourg (64h/an)

TD de génétique (licence 1^{ème} année)

TP de mitose, méiose et gamétogénèse (licence 1^{ème} année)

TP de physiologie du neurone (licence 1^{ème} année)

TP d'histologie du système nerveux (licence 2^{ème} année)

Oct – Déc 18 3 étudiantes de master 1^{ère} année dans le cadre d'un enseignement « projet tutoré »

Jan – Fév20 Cloé Bimboes – 2^{ème} année de BTS, Lycée Rostand Strasbourg

Mars – Avril 20 Arthur Delage – 1^{ère} année de Joint Mater in Neurosciences Strasbourg

Tables des matières

Introduction 14

1 La dépendance à la cocaïne.....14

1.1	<i>La cocaïne</i>	14
1.1.1	Quelques généralités	14
1.1.2	Un problème de santé publique	15
1.2	<i>La dépendance à la cocaïne</i>	16
1.2.1	Le diagnostic de la dépendance	16
1.2.2	La mise en place de la dépendance	18
1.2.3	Les traitements actuels	20
1.2.4	Les modèles animaux.....	22
1.3	<i>Substrats neurobiologiques de la cocaïne</i>	25
1.3.1	Le circuit de la récompense	25
1.3.2	Le système dopaminergique	27
1.3.3	Mécanisme d'action de la cocaïne.....	28
1.3.4	Les adaptations induites par la cocaïne	30

2 La neuroinflammation32

2.1	<i>Qu'est-ce que la neuroinflammation ?</i>	32
2.1.1	Principe	32
2.1.2	Les cellules impliquées.....	33
2.1.3	Signalisation principale : les Toll-like receptors	34
2.2	<i>Le facteur de transcription : NFκB</i>	37
2.2.1	Pourquoi s'intéresser à NFκB ?	37
2.2.2	La voie de signalisation de NFκB	37

3 La neuroinflammation induite par la cocaïne peut-elle expliquer la mémoire et l'apprentissage inadaptes associés à la prise de cocaïne ?.....41

3.1	<i>La dépendance : une pathologie mnésique ?</i>	41
3.2	<i>Revue : Can cocaine-induced neuroinflammation explain maladaptive cocaine-associated memories ? (Correia et al., 2020)</i>	43

Objectifs.....58

Matériels et méthodes61

1 Généralités.....61

1.1	<i>Les animaux</i>	61
1.2	<i>Les substances injectées</i>	61
1.2.1	La cocaïne.....	61
1.2.2	Le solvant	62
1.2.3	Les agents pharmacologiques	62

1.3	<i>La chirurgie : implantation d'un cathéter à demeure dans la veine jugulaire</i>	62
1.3.1	L'implant	62
1.3.2	L'anesthésie et l'analgésie	63
1.3.3	La procédure chirurgicale	63
1.3.4	Soins post-opératoires	64
2	Expériences comportementales	64
2.1	<i>L'auto-administration intraveineuse de cocaïne</i>	64
2.1.1	La boîte opérante.....	64
2.1.2	L'acquisition	65
2.1.3	La dose-réponse en ratio fixe.....	66
2.1.4	La dose-réponse en ratio progressif	66
2.1.5	L'extinction instrumentale	66
2.1.6	L'abstinence forcée.....	66
2.1.7	Réactivation des souvenirs associés aux indices.....	66
2.1.8	La réinstallation induite par les indices.....	68
2.2	<i>L'actographie</i>	68
2.3	<i>Le labyrinthe en croix surélevé</i>	68
2.4	<i>Récapitulatif de l'ensemble des paradigmes expérimentaux</i>	70
3	Prélèvement des tissus cérébraux.....	72
3.1	<i>Anesthésiques</i>	72
3.2	<i>Perfusion intracardiaque et congélation des cerveaux</i>	72
3.3	<i>Prélèvement des tissus frais</i>	72
4	Expériences moléculaires	73
4.1	<i>Marquage sur tissus perfusé</i>	73
4.1.1	Découpe des cerveaux	73
4.1.2	Immunohistofluorescence	74
4.1.3	Imagerie au Nanozoomer	75
4.1.4	Comptage.....	75
4.2	<i>Mesure des niveaux d'ARN totaux</i>	76
4.2.1	Extraction des ARN.....	76
4.2.2	Dosage des ARN	77
4.2.3	Transcription inverse	77
4.2.4	Elaboration et préparation des amorces	78
4.2.5	Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR).....	78
4.2.6	Vérification des amorces.....	80
4.2.7	Calcul de l'expression des gènes.....	80
4.3	<i>Mesure de niveaux protéiques nucléaires et de la liaison à l'ADN de NFκB</i>	81
4.3.1	Extraction des protéines nucléaires	81
4.3.2	Dosage des protéines.....	82
4.3.3	Mesure de l'activation de NFκB	82
5	Analyses statistiques des résultats.....	85
5.1	<i>ANOVA à 2 facteurs</i>	85
5.2	<i>ANOVA à mesures répétées</i>	85

5.3	ANOVA mixte.....	85
5.4	Modèle linéaire mixte.....	86
5.5	Vérification des postulats d'analyses	86

Résultats.....87

Article I : Andrographolide, an NFκB inhibitor, increases voluntary cocaine intake and motivation for the drug in rats	88
Article II : NFκB pathway implication in cue-induced reinstatement of cocaine seeking: a reconsolidation mechanism?	111

Annexes 127

Discussion 134

1. Le rôle de NFκB dans la consommation de cocaïne	134
1.1 <i>La consommation volontaire de cocaïne augmente l'activation du NFκB dans le striatum.....</i>	<i>134</i>
1.2 <i>L'inhibition du NFκB augmente la consommation de cocaïne.....</i>	<i>136</i>
1.3 <i>Par quels mécanismes le NFκB limite-il la consommation de cocaïne ?.....</i>	<i>137</i>
2. Le rôle de NFκB dans la rechute associée à la cocaïne.....	140
2.1 <i>Validation de notre protocole expérimental</i>	<i>140</i>
2.2 <i>Les inhibiteurs du NFκB altèrent la mémoire liée aux indices associés à la cocaïne.....</i>	<i>141</i>
2.3 <i>L'inhibition du NFκB n'altère pas la mémoire liée aux indices en absence d'extinction instrumentale préalable</i>	<i>143</i>
2.4 <i>Expériences supplémentaires pour confirmer l'implication spécifique du NFκB</i>	<i>144</i>
2.5 <i>Les besoins futurs dans ce champ expérimental</i>	<i>146</i>

Conclusion et perspectives 149

Bibliographie 152

Abréviations

A noter : les versions anglaises des abréviations ont été utilisées dans l'intégralité du manuscrit afin de maintenir une cohérence entre le manuscrit en français et les articles en anglais

AAiv/ivSA :	Auto-administration intraveineuse / intravenous self-administration
ACC :	Anterior cingular cortex
AGL :	Andrographolide
AMPA :	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid <i>receptor</i>
BDNF :	Brain-derived neurotrophic factor
BHE :	Barrière hémato-encéphalique
BLA :	Basolateral amygdala
CaMKII :	Ca ²⁺ /calmoduline-dependente kinase II
CB2 :	Cannabinoid receptor 2
CBT :	Cognitive behavioral therapy
CeA :	Central amygdala
CHX :	Cycloheximide
CPP :	Conditioned place preference
CREB :	cAMP response element-binding protein
D1-5R :	Dopamine receptor
DAMP :	Danger-associated molecular patterns
DAT :	Dopamine transporter
DLS :	Dorsolateral striatum
DMS :	Dorsomedial striatum
DMSO :	Dimethyl sulfoxide
DNMT :	DNA methyltransferase
DR :	Dose-response/Dose-réponse
ERK :	Extracellular signal-regulated kinases
FR :	Fixed ratio
HDAC :	Histone désacétylases
IKK :	I κ B kinase
IL :	Infralimbic
IL-1/6 :	Interleukine-1/6
IRAK :	IL1R-associated kinase
IκB :	Inhibitory κ B
JNK :	cJun N-terminal kinase

LA :	Lateral amygdala
LPS :	Lipopolysaccharide
LTD :	Long-terme depression
LTP :	Long-terme potentiation
MAPK :	Mitogen-activated protein kinases
mPFC :	Medial prefrontal cortex
MSN :	Medium spiny neurons
MyD88 :	Myeloid differenciation factor 88
NAc :	Nucleus accumbens
NFκB :	Nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells
NMDAR :	N-methyl-D-aspartate receptor
OFC :	Orbitofrontal cortex
PAMP :	Pathogen-associated molecular patterns
PR :	Progressive ratio
PrL :	Prelimbic
PRR :	Pattern recognition receptor
PSD-95 :	Postsynaptic density protein 95
PTD :	Parthénolide
ROS :	Reactive oxygen specie
SNC :	Système nerveux central
SOD :	Superoxyde dismutase
TLR :	Toll-like receptor
TNF :	Tumor necrosis factor
tVTA:	tail of the VTA
VTA :	Ventral tegmental area

Liste des figures

Introduction

Figure 1 : Les trois phases de la dépendance	19
Figure 2 : Dérégulation de l'homéostasie hédonique induisant un état allostatique	20
Figure 3 : Le système mésocorticolimbique	25
Figure 4 : Principal mode d'action de la cocaïne	29
Figure 5 : Voies de signalisation des TLR	36
Figure 6 : Les différents membres de la voie NFκB	39
Figure 7 : Stimuli d'activation et cibles de NFκB et voie d'activation du NFκB	40
Figure 8 : Processus de consolidation, reconsolidation et extinction et possibilités d'intervention.....	42

Matériels et méthodes

Figure MM1 : Implants pour l'injection i.v.	63
Figure MM2 : Boîte de conditionnement opérant	65
Figure MM3 : Protocole d'AA adapté à l'étude de la mémoire associée à la prise de cocaïne	69
Figure MM4 : Tests comportementaux de locomotion et d'anxiété	70
Figure MM5 : Décours temporels des expériences de consommation et recherche de cocaïne	70-71
Figure MM6 : Délimitation schématique des dissections des structures d'intérêts.....	73
Figure MM7 : Organisation de la répartition des coupes dans les plaques	74
Figure MM8 : Délimitation des structures d'intérêts pour le comptage en IHF	76
Figure MM9 : Protocole de RT-qPCR	80
Figure MM10 : Plan d'une microplaque PCR	81
Figure MM11 : Principe du kit ab133112	83

Article I

Figure 1 : Plan expérimental	106
Figure 2 : Quantification de p-NFκBp65 après un mois de consommation de cocaïne dans le NAc et le striatum dorsal	107
Figure 3 : Effet de l'AGL sur la consommation de cocaïne en dose-réponse en FR	108
Figure 4 : Effet de l'AGL sur la consommation de cocaïne en dose-réponse en PR	109
Sup Fig 1 : Quantification de p-NFκBp65 après un mois de consommation de cocaïne dans le mPFC, l'OFC, le cortex insulaire et l'amygdale	110

Article II

Figure 1 : Effet du PTD et de l'AGL sur la réinstallation de la recherche de cocaïne après une extinction instrumentale	123
Figure 2 : Effet du PTD sur la réinstallation de la recherche de cocaïne après une abstinence forcée	124
Figure 3 : Quantification des ac-NFκBp65 et NFκBp65 pendant la période de reconsolidation de la mémoire des indices associés à la cocaïne	125
Figure 4 : Quantification des ARNm pendant la période de reconsolidation de la mémoire des indices associés à la cocaïne	126

Annexes

Figure A1 : Effet de l'AGL sur les iNP pendant les expériences de dose-réponses en FR	127
Figure A2 : Effet de l'AGL sur les iNP pendant les expériences de dose-réponses en PR	128
Figure A3 : Quantification des ARNm pendant la période de reconsolidation de la mémoire des indices associés à la cocaïne (supplémentaire)	129
Figure A4 : Effet du PTD sur un indice d'anxiété	130
Figure A5 : Effet du PTD sur la locomotion basale et l'hyperlocomotion induite par la cocaïne	131
Figure A6 : Effet de l'AGL sur la locomotion basale	132
Figure A7 : Effet du PTD sur la consommation de cocaïne et l'extinction instrumentale	133

Liste des tableaux

Introduction

Tableau 1 : Critères de diagnostic de la dépendance selon le DSM-V publié en 2013	17
Tableau 2 : Critères de diagnostic de la dépendance selon le ICD-10 publié en 1992	18

Matériels et méthodes

Tableau MM1 : Liste des anticorps utilisés pour l'IHF	75
Tableau MM2 : Liste des amorces utilisées pour les qPCR	79
Tableau MM3 : Liste des anticorps utilisés pour les Western blot	84

Introduction

1 La dépendance à la cocaïne

1.1 La cocaïne

1.1.1 *Quelques généralités*

La cocaïne est une substance naturelle issue des feuilles de l'arbuste *Erythroxylum coca* (Coca). Isolée pour la première fois par le chimiste Albert Niemann en 1860, la cocaïne est, au départ, utilisée par le monde médical pour ses propriétés anesthésiques locales (chirurgie des yeux) et de stimulant (faisant partie de la composition originale du Coca-Cola® jusqu'en 1903). La découverte de ses effets indésirables et son essor dans la société condamne la cocaïne à être catégorisée en 1961 comme substance illicite par l'ONU.

La cocaïne, bien qu'illégale, est toujours largement consommée dans le monde en étant la deuxième drogue illégale la plus consommée après le cannabis (Observatoire des drogues et toxicomanie, OFDT 2012). Elle est utilisée comme psychostimulant et peut être consommée sous deux possibles formes : soit chlorhydrate, soit diluée dans l'eau et réduite par l'ajout d'ammonium ou de bicarbonate de soude (aussi appelé « crack »). La cocaïne est alors consommée par voie intranasale, intraveineuse ou inhalée (Eiden et al., 2020). Elle est principalement métabolisée par le foie en benzoylecgonine et ecgonine methyl ester qui n'ont pas d'action psychoactive et sont éliminés dans les urines (Nayak et al., 1976). Une proportion de la cocaïne absorbée peut être métabolisée en norcocaïne ainsi qu'en cocaéthylène si elle est associée à une consommation d'alcool, deux métabolites ayant des propriétés hépato- et neurotoxiques (Vaz et al., 1994). Sa demi-vie varie selon les espèces allant de 12-18 min chez le rat (Ma et al., 1999) à 40-90 min chez l'Homme (Barnett et al., 1981).

Chez l'Homme, l'exposition à la cocaïne entraîne l'apparition de nombreux effets indépendants de la voie d'administration. En revanche, celle-ci aura un impact sur la durée, l'amplitude et la cinétique de ces effets. Ainsi, la cocaïne induit une stimulation du système nerveux, une diminution de l'appétit et du besoin de sommeil, ainsi que de l'hypertension, une augmentation du tonus musculaire, et de l'hyperthermie. Elle entraîne également une sensation euphorisante avec une exacerbation des contacts avec les autres qui peut durer jusqu'à 45 min après la consommation. Cet état est suivi

d'une période dite de « descente » qui s'accompagne du développement d'une anxiété et d'une irritabilité, ainsi que de sentiments de type dépressifs.

Chez le rongeur, les manifestations des effets de la cocaïne sont majoritairement visibles par une augmentation importante de la locomotion et l'apparition de mouvements stéréotypés (redressement, mouvements d'oscillation de la tête).

1.1.2 Un problème de santé publique

La consommation de cocaïne représente un problème de santé publique mondial en étant la deuxième drogue illégale la plus consommée après le cannabis (World drug report 2020). En 2017, 18 millions de personnes dans le monde ont déclaré avoir consommé de la cocaïne au cours de l'année soit environ 0,4% de la population adulte, des pourcentages s'élevant jusqu'à 2,1% de la population adulte en Amérique du nord et 1,3% en Europe (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, EMCDDA).

La consommation de cocaïne est en constante augmentation ces dernières années. D'une part, le nombre de cas auto-déclarés est en augmentation et, en 2015-2016, il est près du double des années précédentes (Eiden et al., 2020). Ces cas auto-déclarés correspondent surtout aux cas sévères nécessitant des interventions médicales et ne comptabilisent pas la totalité des consommateurs. Le nombre de consommateurs réel est donc sous-évalué. Afin d'avoir une idée plus objective, les eaux usées de plusieurs grandes villes d'Europe ont été analysées. Celles-ci confirment cette tendance avec une augmentation des concentrations de benzoylecgonine allant de 281–331 mg / 1000 habitants / jour entre 2011–2013 à 329–373 mg / 1000 habitants / jours entre 2014–2017 dans plusieurs villes réparties dans toutes l'Europe (Barcelone, Genève, Zurich, St Gallen, Bristol, Milan, Dortmund, Dulmen et Zagreb) (González-Mariño et al., 2020).

Cette augmentation de la consommation de cocaïne dans le monde et en France peut s'expliquer par une augmentation de la production permettant une augmentation de la disponibilité sur le marché illégal et la diminution importante des prix ; ainsi en Colombie, les cultures de feuilles de Coca sont passées de 4,7 tonnes/hectare en 2014 à 5,7 tonnes/hectare en 2018 (World drug report 2020).

La cocaïne vendue est systématiquement coupée avec d'autres produits moins coûteux (paracétamol, caféine, lidocaïne ou lévamisole) donnant ainsi des degrés de pureté variant entre 0 et 60 % sur le marché illégal (Kudlacek et al., 2017). Ces dernières années il semble que les degrés de pureté soient de plus en plus élevés possiblement dû à la baisse des prix. Les taux de pureté plus élevés expliquent en parallèle l'augmentation des complications qui vont à terme accroître l'impact sociétal de la consommation de cocaïne.

Il est intéressant de noter que le nombre de personnes recherchant pour la première fois un traitement contre leur dépendance à la cocaïne a sensiblement augmenté depuis 2014, notamment en France (Antoine et al., 2020). Les consommateurs recherchent un traitement seulement après quelques années de consommation problématique ; il est donc envisageable que la demande pour un traitement augmente encore dans les années à venir en conséquence de l'augmentation actuelle de la consommation.

De plus, la consommation régulière de cocaïne entraîne de nombreuses complications sur la santé : psychiatrique (29%), neurologique (24%), cardiovasculaire (23%), infectieuse (11%), respiratoire (6%), ou encore oto-rhino-laryngologiques (2%) (Eiden et al., 2020) accentuant d'autant plus le poids sociétal et humain de la consommation de cocaïne. La consommation de cocaïne est d'autant plus problématique qu'une proportion importante des consommateurs développe une dépendance à la cocaïne perpétuant leur consommation.

1.2 La dépendance à la cocaïne

1.2.1 *Le diagnostic de la dépendance*

La dépendance est un trouble psychiatrique caractérisé par une perte de contrôle de la recherche et de la consommation d'une substance psychoactive. Cela se traduit notamment par la prise compulsive de la drogue, et ce malgré la conscience de ses conséquences nocives (Koob and Volkow, 2016). La consommation est tout d'abord occasionnelle et récréative. Puis, avec la répétition des prises de drogue, la dépendance se met progressivement en place. De plus, la dépendance se caractérise par la récurrence d'événements de rechute et ce même après de longues périodes d'abstinence, rendant cette pathologie résistante aux traitements. De nombreux déclencheurs et stimuli peuvent provoquer ces rechutes récurrentes : le stress, l'exposition à la drogue ou encore l'exposition aux indices environnementaux associés à la consommation (Shaham et al., 2003).

La dépendance est diagnostiquée grâce à différents critères, établis aujourd'hui par le DSM V (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders Vth edition, **Tableau 1**) ou par l'ICD-10 (Classification Internationale des Maladies par l'OMS, **Tableau 2**). Ces critères, similaires entre les deux classifications, permettent de déterminer le degré de sévérité de l'état de dépendance du sujet. Le nombre de critères que présente un sujet indique la sévérité de la pathologie. Pour la cocaïne, on estime que 17% des consommateurs réguliers développent des symptômes de dépendance (OFDT 2012) et passent ainsi de la phase récréative à la phase de dépendance. D'autres modes de classifica-

tion sont proposés, notamment le « Research Domain Criteria » (RDoC), basé sur un classement des troubles psychiatriques en fonction de différents niveaux d'analyses (gènes, molécules, cellules, circuits, physiologie, comportements, descriptions subjectives) dans et entre des domaines de fonctionnement : « negative valence system », « positive valence system », « cognitive systems », « social processes » et « arousal and regulatory systems » (Lamontagne and Olmstead, 2019).

Critères DSM-V
1. Beaucoup de temps consacré à la recherche de substances
2. Désir ou efforts persistants pour diminuer les doses
3. Perte de contrôle sur la quantité et le temps dédié à la prise de substance
4. Besoin impérieux et irrésistible de consommer la substance ou de jouer (« craving »)
5. Incapacité de remplir des obligations importantes
6. Problèmes personnels ou sociaux
7. Activités réduites au profit de la consommation
8. Usage même lorsqu'il y a un risque physique
9. Poursuite de la consommation malgré les dégâts physiques ou psychologiques
10. Augmentation de la tolérance au produit addictif
11. Présence d'un syndrome de sevrage («withdrawal»), c'est-à-dire de l'ensemble des symptômes provoqués par l'arrêt brutal de la consommation
2-3 dépendance légère ; 4-5 dépendance modérée ; >6 dépendance sévère

Tableau 1 : Critères de diagnostic de la dépendance selon le DSM-V publié en 2013 (version française issue du site drogues.gouv.fr)

Critères CIM-10

1. Désir puissant ou compulsif d'utiliser une substance psychoactive
2. Difficultés à contrôler l'utilisation de la substance (début ou interruption de la consommation ou niveaux d'utilisation)
3. Syndrome de sevrage physiologique quand le sujet diminue ou arrête la consommation d'une substance psychoactive, comme en témoignent la survenue d'un syndrome de sevrage caractéristique de la substance ou l'utilisation de la même substance (ou d'une substance apparentée) pour soulager ou éviter les symptômes de sevrage
4. Mise en évidence d'une tolérance aux effets de la substance psychoactive : le sujet a besoin d'une quantité plus importante de la substance pour obtenir l'effet désiré
5. Abandon progressif d'autres sources de plaisir et d'intérêts au profit de l'utilisation de la substance psychoactive, et augmentation du temps passé à se procurer la substance, la consommer, ou récupérer de ses effets
6. Poursuite de la consommation de la substance malgré la survenue de conséquences manifestement nocives. On doit s'efforcer de préciser que le sujet était au courant, ou qu'il aurait dû être au courant, de la nature et de la gravité des conséquences nocives.

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

Tableau 2 : Critères de diagnostic de la dépendance selon le ICD-10 publié en 1992 (issue du site who.int)

1.2.2 La mise en place de la dépendance

La dépendance est une pathologie complexe qui se met en place progressivement. Afin de mieux la comprendre et la caractériser, plusieurs auteurs ont proposé différentes théories. Il apparaît que cette pathologie est régie par l'émergence d'un cycle récurrent en trois phases : « binge and intoxication », « withdrawal and negative effect » et « preoccupation and anticipation » (**Figure 1** ; Koob and Volkow, 2016; Volkow et al., 2016). Ainsi, la phase de « binge and intoxication » correspond à l'augmentation de l'association entre les effets renforçateurs de la substance et les stimuli environnementaux par le biais d'apprentissages Pavloviens permis par la répétition des événements. La phase de « withdrawal and negative effect » correspond d'une part à la diminution de la sensibilité du système aux effets renforçateurs (tolérance) et la stimulation des systèmes « anti-récompensant » liés au stress et aux émotions négatives. Ainsi, les personnes vont présenter des états dysphoriques et anxieux en absence de la substance et perpétuer leur consommation afin de contrer ces effets négatifs. Enfin, la phase de « preoccupation and anticipation » correspond à une diminution des fonctions

exécutives (auto-régulation, prise de décision, flexibilité, contrôle de l'inhibition comportementale et attribution des saillances) (Volkow et al., 2016).

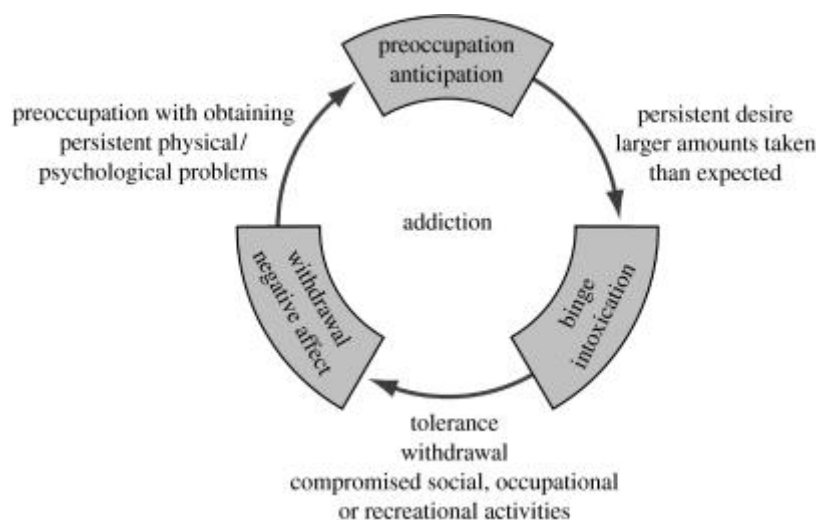


Figure 1 : Les trois phases de la dépendance (image issue de Koob and Le Moal, 2008)

Au fil des années, plusieurs théories ont été proposées pour expliquer l'évolution progressive de la pathologie entre les différentes phases.

- « The hedonic theory » ou La théorie des renforcements positif et négatif repose sur l'idée qu'un comportement à l'origine d'un effet « récompensant » ou « plaisant » est plus susceptible d'être répété : on parle alors de renforcement positif. Dans ce contexte, une personne expérimentant les effets plaisants de la cocaïne sera plus apte à renouveler sa consommation. De la même manière, un comportement permettant l'absence d'un stimulus aversif est lui aussi plus susceptible d'être répété : on parle alors de renforcement négatif. Ainsi, l'apparition des symptômes déplaisants associés au sevrage va promouvoir le renouvellement des consommations afin de contrer les effets négatifs (Feltenstein and See, 2008).

- « The counteradaptation theory » ou La théorie de la « neutralisation » consiste en la mise en place de mécanismes compensatoires pour contrer les effets de la drogue. Ainsi, ces modifications et adaptations induisent un déséquilibre du système de récompense qui perdure sur le long terme. Ceci expliquerait qu'un individu reste vulnérable aux drogues et ce même après une période d'abstinence (Koob and Le Moal, 1997; Roberts and Koob, 1997). Parmi ces modifications, la dérégulation de l'homéostasie de l'humeur (ou allostasie) postule que les effets « plaisants » de la drogue s'amenuisent au cours du temps alors que les effets « déplaisants » du sevrage s'amplifient (**Figure 2**). Cette dérégulation bascule le consommateur vers un état anhédonique qui promeut la répétition des consommations.

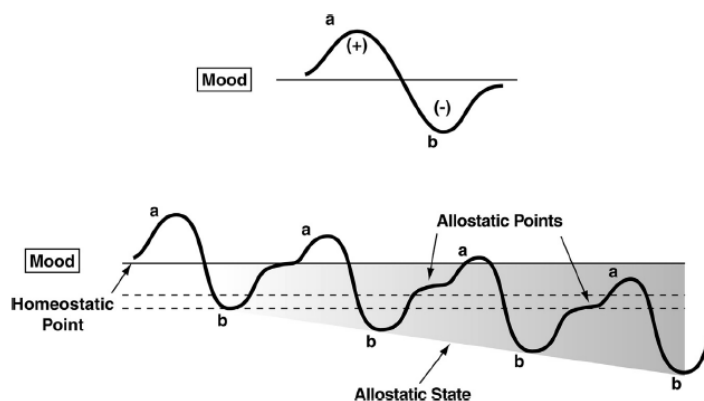


Figure 2 : Dérégulation de l'homéostasie hédonique induisant un état allostatique (image issue de Koob, 2015)

- « The sensitization theory » ou La théorie de la sensibilisation postule qu'il existe deux aspects distincts dans la consommation de drogue, d'une part le « liking » ou « valeur hédonique » et d'autre part le « wanting » ou « valeur motivationnelle ». Cette théorie stipule que la répétition des événements de consommation entraîne une sensibilisation du système dopaminergique induisant une augmentation de la valeur motivationnelle (Berridge, 2004).

- « The maladaptive associative learning theory » ou La théorie de l'apprentissage inadapté repose sur l'observation d'une transition dans le comportement de recherche et de consommation au cours de la mise en place de la pathologie. Le comportement de recherche et de consommation est initialement contrôlé, volontaire et dirigé vers un but (l'obtention de l'effet renforçant). A force des répétitions des événements de consommation, ce comportement devient incontrôlé et automatisé (Everitt, 2014). En parallèle, la répétition des événements de consommation conduit à la formation de souvenirs renforcés entre les effets pharmacologiques de la drogue et les indices environnementaux, de façon Pavlovienne. Les indices deviennent alors de puissants prédicteurs promouvant la recherche, la prise de la substance ainsi que les rechutes récurrentes (Everitt, 2014, voir partie 3.1).

Toutes ces théories permettent d'expliquer plusieurs phases de la mise en place de la pathologie. En revanche, aucune d'elles ne permet, à elle seule, d'expliquer l'ensemble de la dépendance.

1.2.3 Les traitements actuels

L'une des raisons pour lesquelles la dépendance à la cocaïne représente un problème de santé publique est qu'il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement réellement efficace pour aider les per-

sonnes dépendantes à arrêter de façon durable. Actuellement, seuls les accompagnements psychosociaux, qui démontrent une efficacité relative, sont utilisés. Malgré de nombreuses études, aucun agent pharmacologique n'a pu être approuvé dans le traitement contre la dépendance à la cocaïne.

En 2019, la revue de Kampman (2019) résume l'état des lieux des traitements actuels pour contrer la dépendance à la cocaïne, dont voici une liste non-exhaustive :

*** Les interventions psychosociales :**

- « Intensive outpatient therapy (IOT) » ou programme ambulatoire intensif : il consiste en plusieurs séances de thérapie individuelle, en groupe ou en famille avec un professionnel. Cette thérapie montre une bonne efficacité pour diminuer la consommation mais souffre d'une proportion élevée d'abandon du traitement.

- « Voucher-based reinforcement therapy (VBRT) » ou renforcement basé sur la remise de bons : cette thérapie consiste à offrir aux patients des bons cadeaux quand ceux-ci valident des objectifs d'abstinence. Elle se base sur l'idée que les comportements récompensés par le biais d'un renforcement positif ont plus tendance à être répétés. Cette thérapie montre une bonne efficacité pour promouvoir le début de l'abstinence mais souffre de phénomène de réémergence à l'arrêt de la thérapie et des renforcements, ainsi que des questionnements éthiques.

- « Cognitive behavioral therapy (CBT) » ou thérapie cognitive-comportementale (TCC) : cette thérapie consiste à apprendre aux patients (1) à reconnaître les situations susceptibles de provoquer des épisodes de *craving* (envie irrésistible de consommer la substance) et de les éviter, et (2) plusieurs techniques pour surmonter de manière positive le craving. Cette thérapie est celle qui montre le plus d'efficacité notamment sur le long terme.

- « Conditioned-stimulus extinction » ou l'extinction des indices associés : cette thérapie consiste à présenter un grand nombre de fois un ensemble d'indices auparavant associés à la consommation et pouvant provoquer des épisodes de *craving* afin qu'ils perdent leur valeur prédictive. Cette technique fonctionne en thérapie mais ne perdure pas une fois la personne sortie des centres médicalisés.

* Les essais cliniques pharmacologiques :

Parmi les agents pharmacologiques testés en études cliniques, on trouve les méthamphétamines de longue action (dextra-amphétamine ou des mixtes de sels d'amphétamines), un inhibiteur des transporteurs de recapture de la dopamine (DAT) (le modafinil), ainsi qu'un agoniste GABAergique et un antagoniste glutamatergique (le topiramate). Ces études ont plutôt montré une efficacité de ces agents pour réduire la consommation, en diminuant le nombre de jours de consommation et en augmentant la durée des périodes d'abstinence de l'ordre de quelques semaines chez certains patients. En revanche, d'autres études ne montrent pas d'effet significatif sur les patients. Ces disparités semblent s'expliquer par le taux de sévérité de la dépendance ainsi que par la présence d'autres dépendances, notamment la consommation d'alcool (pour le modafinil) ou les opioïdes (pour le topiramate) (Kampman, 2019). Des molécules ciblant d'autres mécanismes ont également été testées en études cliniques, dont la N-acétylcystéine, qui active l'échangeur cystéine/glutamate (LaRowe et al., 2007, 2013) ou le propranolol, antagoniste β -adrénergique (Lonergan et al., 2016). Ces études ont montré une diminution de l'intérêt des patients pour la drogue et/ou du *craving* induit par des indices associés à la consommation de cocaïne, ainsi qu'une augmentation du temps d'abstinence chez les patients déjà abstinents.

Globalement, ces différentes études souffrent de faibles niveaux de rétention des patients dans les études soit par abandon soit en raison de critères d'inclusion trop stricts. Malgré certaines études encourageantes dans l'ensemble, ces résultats manquent d'effectifs suffisants et de reproductibilité. Ainsi, ces études, bien que prometteuses pour les méthamphétamines à longue action ou la N-acétylcystéine, doivent être répétées avec des effectifs plus importants de patients. Il semblerait que la combinaison de plusieurs agents pharmacologiques et de thérapies psychosociales comme le CBT soit une piste envisageable pour la dépendance à la cocaïne.

1.2.4 Les modèles animaux

Dans le but d'étudier les mécanismes moléculaires sous-tendant la mise en place de cette pathologie, différentes approches comportementales ont été mises au point chez l'animal et notamment le rongeur : l'auto-administration intraveineuse (AAiv), la préférence de place conditionnée (« conditioned place preference », CPP) ou encore la sensibilisation locomotrice. Ces techniques permettent d'étudier des paramètres différents dans la mise en place de la dépendance à la cocaïne. Ce paragraphe ne se veut pas exhaustif, seules certaines techniques sont décrites afin de souligner leurs principaux intérêts.

*** La sensibilisation locomotrice :**

L'un des effets de la cocaïne chez le rongeur est l'augmentation aiguë et transitoire de l'activité locomotrice. Il a été remarqué que des injections répétées d'une même dose de cocaïne (allant de 10 à 20 mg/kg i.p.) induisent une hyperlocomotion plus importante que celle observée à l'issue d'une première injection. Ce phénomène est appelé sensibilisation locomotrice et peut perdurer plusieurs semaines (Hope et al., 2006). Ainsi, cette technique permet d'étudier les effets immédiats induits par la cocaïne qui entraînent des répercussions moléculaires et comportementales sur le long terme. L'étude des mécanismes sous-jacents de cet effet permet la compréhension de mécanismes neurobiologiques impliqués dans les processus de plasticité comportementale induite par la cocaïne (Steketee and Kalivas, 2011).

*** La préférence de place conditionnée (CPP) :**

Le conditionnement de place se base sur un apprentissage Pavlovien et consiste à permettre à l'animal d'associer un environnement avec les effets pharmacologiques de la cocaïne (Prus et al., 2009). Les animaux vont recevoir une injection de cocaïne et être confinés dans un compartiment spécifique. À la suite d'une injection de solution saline (NaCl 0,9%) les animaux sont confinés dans un compartiment différent du premier. La répétition de ce conditionnement se fait de manière alternée pendant plusieurs jours. Au bout de quelques jours (la durée totale varie selon les protocoles), le choix est laissé à l'animal d'explorer librement les deux compartiments en absence de drogue. Une CPP pour la cocaïne sera notée si l'animal passe significativement plus de temps dans le compartiment associé à la cocaïne que dans celui associé à la solution saline. Ce test permet d'étudier les caractéristiques appétitives ou aversives d'une substance, ainsi que les processus mnésiques impliqués dans la mémorisation d'associations entre les indices environnementaux et les effets de la cocaïne (Tzschentke, 2007). Ce protocole peut permettre de faire des mesures d'extinction ou de réinstallation (voir partie AAiv ci-dessous) du comportement. Par ailleurs, la CPP permet aussi l'étude de la mémoire associée à la cocaïne notamment de par des mécanismes de reconsolidation (voir partie 3.2 et table 2 Correia et al., 2020). Malgré tout, l'utilisation de la CPP pour ce type d'étude reste restreinte à la mémoire associée aux indices contextuels.

* L'auto-administration intraveineuse (AAiv) :

L'auto-administration intraveineuse, quant à elle, se base sur un conditionnement opérant où les animaux vont apprendre qu'un comportement précis (par exemple, appuyer sur un levier ou mettre son museau dans un orifice) entraîne la distribution d'une dose de cocaïne en i.v. éventuellement associée à la présentation de plusieurs indices contingents. Cette technique est la seule qui permette de modéliser un comportement de consommation volontaire chez l'animal. Ce comportement repose sur deux types d'apprentissages : Pavlovien (l'association entre les indices contingents aux effets pharmacologiques de la cocaïne) et instrumental (le comportement permettant l'apparition des indices associés au renforçateur) (Delamater and Oakeshott, 2007).

Plusieurs programmes de renforcement peuvent être utilisés lors de la consommation : en « fixed ratio » (**FR**) où le nombre de réponses nécessaire pour obtenir une injection de cocaïne reste le même au cours de la session ou en « progressive ratio » (**PR**) où le nombre de réponses nécessaires pour obtenir une injection de cocaïne augmente de manière exponentielle au cours d'une même session. Alors que le FR permet de mesurer l'acquisition et la stabilisation du comportement, le PR permet de mesurer un indice de motivation (la quantité de travail que l'animal est prêt à fournir pour une seule injection) (Richardson and Roberts, 1996).

L'utilisation d'une étape d'**extinction instrumentale** de l'AAiv permet d'analyser le comportement des animaux quand la cocaïne n'est plus délivrée à la suite de leur réponse (recherche de cocaïne) et ainsi, de mesurer un indice de persistance du comportement et de flexibilité à apprendre un nouvel apprentissage (la réponse n'est plus associée ni aux effets de la cocaïne ni à la présentation des indices) (Bouton, 2019).

L'AAiv permet également de modéliser des phénomènes de rechute par le biais de la réinstallation du comportement de recherche après une période d'abstinence forcée et/ou d'extinction instrumentale. La **réinstallation** peut être provoquée par la présentation des indices associés à la cocaïne, à un stress ou à une injection de cocaïne (Shaham et al., 2003).

Par ailleurs, il existe plusieurs possibilités d'adaptation de ce protocole pour étudier d'autres paramètres liés à la dépendance à la cocaïne comme la consommation malgré des **conséquences négatives**, en ajoutant des décharges électriques légères à la suite de la réponse comportementale de recherche permettant l'auto-administration de cocaïne (Deroche-Gamonet et al., 2004).

Enfin, il est également possible d'adapter l'AAiv pour l'étude de la mémoire associée à la consommation de cocaïne par le biais de protocoles de **reconsolidation** (approche que j'ai utilisée pendant la thèse et qui sera détaillée dans la partie 3.2). Ces études ont pour but de comprendre les mécanismes

sous-tendant les processus mnésiques impliqués dans l'apprentissage inadapté induit par la cocaïne (théorie exposée partie 1.2.2, Bender and Torregrossa, 2020; Everitt, 2014).

De manière générale, l'utilisation de l'AAiv permet une modélisation de plusieurs aspects comportementaux associés à la dépendance à la cocaïne. L'évolution des modèles précliniques permet à terme de se rapprocher au plus des critères diagnostiques de la dépendance (Belin-Rauscent et al., 2016).

1.3 Substrats neurobiologiques de la cocaïne

1.3.1 *Le circuit de la récompense*

Le système mésocorticolimbique aussi appelé circuit de la récompense (**Figure 3**) a été décrit pour la première fois suite aux expériences d'autostimulation chez le rat (Olds and Milner, 1954) et complétées par de nombreuses autres études chez le rongeur utilisant des injections *in situ* (Ikemoto, 2010). Ce système est principalement composé de l'aire tegmentale ventrale (VTA « ventral tegmental area »), du noyau accumbens (NAc) et du cortex préfrontal (PFC « prefrontal cortex »), ainsi que de plusieurs autres structures (amygdale, hippocampe, ...).

Le circuit de la récompense a un rôle fonctionnel dans l'établissement de comportements motivés pour des renforçateurs naturels essentiels à la survie de l'espèce : alimentation et reproduction (Robbins and Everitt, 1996). Un système qui va être, à terme, détourné par les drogues.

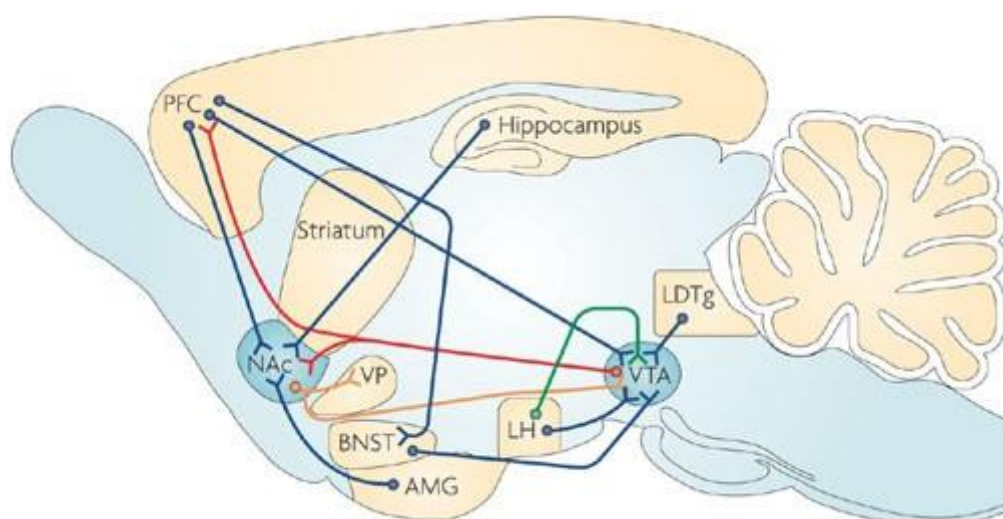


Figure 3 : Le système mésocorticolimbique et ses principales projections dopaminergiques (rouge), glutamatergiques (bleu) et GABAergiques (jaune). AMG : amygdale, BNST : noyau du lit de la strie terminale, LH : hypothalamus latéral, NAc : noyau accumbens, PFC : cortex préfrontal, VP : pallidum ventral, VTA : aire tegmentale ventrale (image issue de Kauer and Malenka, 2007)

Bien que toutes les drogues présentent des mécanismes d'action initiaux différents (interaction avec des récepteurs, blocage de canaux ou de transporteurs...), elles entraînent à terme une augmentation de la neurotransmission dopaminergique au niveau du système mésocorticolimbique (Di Chiara and Imperato, 1988). Notamment, plusieurs études ont démontré par microdialyse une augmentation de la concentration de dopamine au niveau du NAc pendant des sessions d'auto-administration de cocaïne avec des augmentations allant de 200 à 800% selon les doses de cocaïne administrées (Pontieri et al., 1995; Wise et al., 1995). De manière intéressante, alors que les augmentations des concentrations de dopamine dans le NAc en réponse aux renforçateurs naturels semblent s'étonner avec les répétitions, dans le cas d'administration chronique de cocaïne, l'augmentation de ces concentrations perdure mais semble au fil des répétitions répondre aux stimuli prédictifs plus qu'aux injections mêmes de cocaïne (Wise et al., 1995, 2008).

Le système mésocorticolimbique est majoritairement composé de projections dopaminergiques allant de la VTA vers des structures limbiques (NAc, amygdale, pallidum ventral et hippocampe) et vers des structures corticales (PFC) (Feltenstein and See, 2008). Ces différentes structures ont des rôles distincts et complémentaires dans la mise en place et le maintien de la pathologie (Feltenstein and See, 2008).

Le NAc et le pallidum ventral sont plutôt impliqués dans les premiers effets d'apprentissage associatif entre un stimulus et un effet renforçateur permettant la mise en place de comportements motivés (Corbit and Balleine, 2016), l'amygdale et l'hippocampe sont impliqués dans les apprentissages conditionnés (Wassum and Izquierdo, 2015) ; le PFC est, quant à lui, impliqué dans la prise de décision ainsi que le contrôle cognitif et exécutif (Moorman et al., 2015). Par ailleurs, d'autres structures associées ont également des rôles importants dans l'établissement de la dépendance à la cocaïne. Le striatum dorsal reçoit également des afférences dopaminergiques en provenance de la VTA. Il a un rôle dans le conditionnement instrumental et la planification du comportement de recherche de cocaïne (Burton et al., 2015). Notamment, il est impliqué dans le passage d'un comportement de recherche de type « dirigé vers un but » (ou « goal-directed ») à un comportement de recherche de type « automatisé » (ou « habits ») qui promeut la perpétuation du comportement de consommation (Everitt, 2014). Enfin, des études récentes ont également souligné l'importance d'une nouvelle structure : la queue de l'aire tegmentale ventral (tVTA, Bourdy and Barrot, 2012). Cette structure principalement GABAergique semble être inhibée par l'administration de cocaïne (Lecca et al., 2011) et cette inhibition entraînerait la désinhibition de la VTA.

1.3.2 *Le système dopaminergique*

De nombreuses études ont démontré l'importance de la neurotransmission dopaminergique au sein du circuit de la récompense. La dopamine peut se lier à cinq récepteurs tous couplés à des protéines G (D1 à D5). Parmi ses récepteurs, on distingue deux sous-catégories : les D1 et D5 qui sont couplés à des protéines Gs, et les D2, D3 et D4 qui sont couplés à des protéines Gi/o (Missale et al., 1998). Les récepteurs de la famille D1 sont localisés sur les membranes postsynaptiques, alors que les récepteurs de la famille D2 peuvent être localisés soit sur les membranes présynaptiques et ont ainsi un rôle d'autorécepteurs, soit sur les membranes postsynaptiques. Le système dopaminergique comprend également des transporteurs à douze segments transmembranaires, les DAT, qui ont un rôle dans la recapture de dopamine du milieu extracellulaire (Torres, 2006).

La dopamine libérée dans le NAc aurait un rôle primordial dans l'apprentissage associatif (Corbit and Balleine, 2016). En effet, par le biais d'études utilisant la technique du transfert Pavlovien instrumental, il a été montré que l'administration d'antagonistes des récepteurs dopaminergiques dans le NAc altère les capacités des animaux à transférer une réponse instrumentale à une nouvelle récompense (Lex and Hauber, 2008). De plus, par le biais de mesure en « fast-scan cyclic voltammetry », il a été mesuré une libération de dopamine dans le NAc par la seule présentation des indices associés à une récompense, l'amplitude de cette libération étant corrélée avec celle du transfert instrumental Pavlovien (Wassum et al., 2013). Cette observation soutient d'autant plus l'implication de la dopamine dans l'apprentissage associatif des indices prédisant une récompense. D'autres auteurs soutiennent une fonction de la dopamine dans l'erreur de prédiction (Schultz, 2016). En effet, il a été observé, par des enregistrements électrophysiologiques, que les neurones dopaminergiques répondaient à une récompense seulement si celle-ci différait de la prédiction. Dans ce cas, il a été mesuré que les neurones dopaminergiques répondaient de manière plus importante quand la récompense était plus importante que la prédiction et moins importante quand la récompense était absente ou moins importante que la prédiction. Enfin, d'autres auteurs soutiennent une fonction de la dopamine dans les processus motivationnels et liés à la dépense énergétique (Salamone et al., 2016). L'épuisement de la dopamine au niveau du NAc diminue le comportement d'auto-administration de nourriture en fonction de l'augmentation de l'effort demandé (Ishiwari et al., 2004; Salamone et al., 2001). Ainsi, des programmes de renforcement FR1 n'étaient pas altérés (Ishiwari et al., 2004), alors que des programmes FR20 ou FR50 étaient partiellement altérés et des programmes de renforcement FR200 et FR300 étaient sévèrement altérés (Salamone et al., 2001). De plus, l'épuisement de la dopamine agit sur l'effort demandé à l'animal mais n'a pas d'effet sur la force physique à développer (ajout de poids sur les leviers à manipuler par l'animal) pour obtenir la récompense (Ishiwari et al., 2004).

Par ailleurs, malgré le rôle central de la neurotransmission dopaminergique, d'autres neuromodulateurs ont un rôle important dont par exemple le glutamate et le GABA (voir **Figure 3**). Les neurones dopaminergiques de la VTA sont eux-mêmes régulés par des interneurons GABAergiques locaux et des projections GABAergiques en provenance du pallidum ventral, du NAc et de la tVTA, ainsi que par des projections glutamatergiques venant du PFC (Kauer and Malenka, 2007). Notamment, une répétition des expositions à la drogue induit des adaptations de la neurotransmission glutamatergique entre le PFC et le NAc contribuant à la perpétuation du comportement en diminuant le contrôle cognitif et augmentant la réponse aux indices/stimuli associés à la prise de cocaïne (Kalivas and Volkow, 2005).

1.3.3 Mécanisme d'action de la cocaïne

La cocaïne a principalement une action inhibitrice des systèmes de la recapture des monoamines (dopamine, sérotonine, noradrénaline) (Ikemoto, 2010). En bloquant la fonction de ces transporteurs, la cocaïne provoque une augmentation de la concentration extracellulaire de ces neurotransmetteurs et donc une augmentation globale de la neurotransmission monoaminergique (**Figure 4**, Di Chiara and Imperato, 1988). Il semble que les effets renforçateurs de la cocaïne soient majoritairement médiés par le système dopaminergique et son action sur les systèmes de la recapture de la dopamine (DAT) (Ikegami and Duvauchelle, 2004; Volkow et al., 1997). Des études d'imagerie chez l'homme ont révélé une corrélation entre le sentiment déclaré d'euphorie ou « high » et l'occupation des DAT (Volkow et al., 1997). Des analyses de microdialyse montrent que la consommation de cocaïne entraîne une augmentation de la concentration extracellulaire de dopamine de manière dose-dépendante (Moghaddam and Bunney, 1989; Pontieri et al., 1995). Une augmentation de la concentration extracellulaire de dopamine dans le striatum est également mesurée par la seule présentation des indices associés à la cocaïne, suggérant une fonction dans l'anticipation (Ito et al., 2002). D'un point de vue comportemental, l'administration d'antagonistes des récepteurs dopaminergiques altère la réponse des rats à la cocaïne. Ainsi, une faible dose d'antagoniste augmente le comportement d'AAiv alors qu'une forte dose d'antagoniste le réduit (Hubner and Moreton, 1991). Par ailleurs, l'inhibition des D1, et non des D2, au niveau du NAc, altère la mémoire du contexte associé aux effets pharmacologiques de la cocaïne et réduit ainsi la CPP (Li et al., 2016).

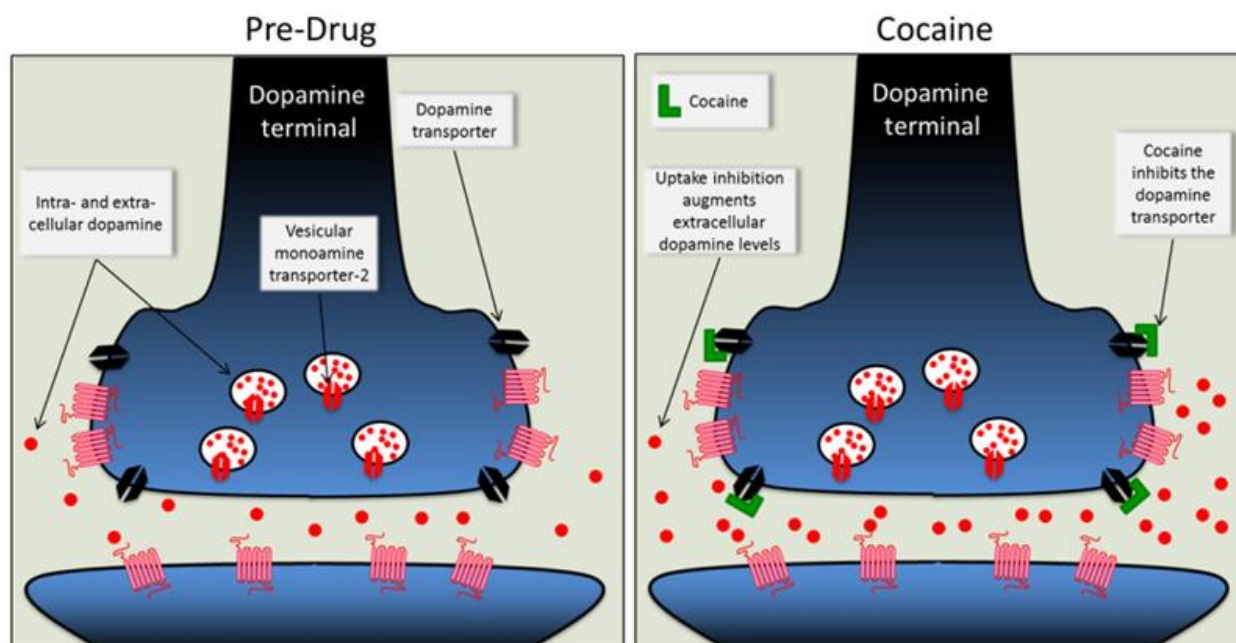


Figure 4 : Principal mode d'action principal de la cocaïne au niveau du système dopaminergique (image issue de Siciliano et al., 2015)

Cependant, des études utilisant des souris transgéniques DAT-KO ont démontré que l'action de la cocaïne sur les DAT n'était pas exclusive. En effet, ces animaux montrent un comportement de consommation en AAiv (Rocha et al., 1998) et la capacité à développer une CPP (Sora et al., 1998). Par ailleurs, la cocaïne est toujours capable d'induire une augmentation de la libération de dopamine dans le NAc chez ces souris (Carboni et al., 2001). Ainsi, d'autres mécanismes sont impliqués dans l'augmentation des concentrations extracellulaires de dopamine dans le NAc, possiblement les autres monoamines, mais d'autres auteurs proposent un mécanisme alternatif. En effet, des études récentes reportent une action directe de la cocaïne sur d'autres types de récepteurs, les Toll-Like récepteurs (TLR, voir partie 2.1.3). Par le biais d'expériences *in silico* et *in vitro*, Northcutt et coll. (2015) ont décrit une action directe de la cocaïne sur les TLR4, sur le même site de reconnaissance du LPS (lipopolysaccharide). Deux études chez l'animal ont quant à elles démontré que la modulation de ces récepteurs influence l'augmentation, induite par la cocaïne, de la libération de dopamine dans le NAc (Northcutt et al., 2015; Tanda et al., 2016). La première étude a montré que l'injection de LPS-RS, un antagoniste spécifique de TLR4, dans la VTA, atténue la libération de dopamine induite par une injection i.p. de cocaïne dans le NAc ; de manière intéressante, la stimulation du TLR4 par une injection de LPS dans la VTA induit à elle seule une libération, bien que de moindre amplitude, de dopamine dans le NAc (Northcutt et al., 2015). La seconde étude a montré que l'administration de (+)naltrexone, un antagoniste TLR4, augmentait la libération de dopamine dans le NAc pour de fortes doses de cocaïne (1 mg/kg, i.v.) (Tanda et al., 2016).

1.3.4 Les adaptations induites par la cocaïne

Plusieurs études se sont intéressées aux effets moléculaires aigus et prolongés d'une administration ou consommation de cocaïne (Ahmed et al., 2005; Clark et al., 2013; De Sa Nogueira et al., 2019; Korpi et al., 2015; Piechota et al., 2010; Renthal et al., 2007). Ces études ont mis en lumière une importante quantité de modifications et adaptations induites par la drogue, aussi ce paragraphe ne se veut pas exhaustif mais souligne seulement quelques points pertinents.

Tout d'abord, l'une des raisons expliquant la dépendance à la cocaïne est que la consommation de cocaïne module l'expression de nombreux gènes, induisant ainsi des modifications à long terme (Korpi et al., 2015). Une étude menée au laboratoire avant mon arrivée a démontré, par le biais d'une analyse du méthylome, que l'AAiv de cocaïne chez le rat faisait émerger presque 189 000 régions différentiellement méthylées dans le PFC, comparé à des rats contrôles (Fonteneau et al., 2017). Parmi ces régions, 9% se trouvent dans les séquences promotrices. Une analyse « literature-based ingenuity pathway » a permis de mettre en évidence des voies de signalisation affectées par la cocaïne. Parmi les voies les plus significatives, on retrouve la voie centrée autour de ERK1/2 ainsi que celle centrée autour du NFκB (Fonteneau et al., 2017). D'autres études ont également identifié de nombreux gènes différentiellement régulés par la consommation ou l'arrêt de la consommation de cocaïne (Ahmed et al., 2005; De Sa Nogueira et al., 2019; Piechota et al., 2010). Par exemple, Freeman et coll. (2010) ont mis en évidence, par le biais d'une technique d'analyse globale du transcriptome, des régulations différentes selon la durée de l'abstinence (1, 10 ou 100 jours) au niveau du NAc et du PFC médian (mPFC). Dans une première catégorie (les gènes dont l'expression est altérée par la consommation et dont l'altération ne persiste pas pendant l'abstinence), on retrouve 793 des 1461 gènes dans le mPFC et 68 des 414 gènes dans le NAc. Dans une deuxième catégorie (les gènes dont l'expression est altérée par la consommation et dont l'altération persiste pendant l'abstinence), on retrouve 188 des 1461 gènes dans le mPFC et 32 des 414 gènes dans le NAc. Enfin, dans une troisième catégorie (les gènes dont l'expression est altérée seulement pendant l'abstinence), on retrouve 480 des 1461 gènes dans le mPFC et 314 des 141 gènes dans le NAc. En tout, parmi les 1875 gènes dont l'expression était altérée, seuls 3% étaient en commun entre le mPFC et le NAc. Parmi les gènes différentiellement régulés, on retrouve le D5R (catégorie 2 dans le mPFC), GFAP (catégorie 3 dans le NAc), Arc (catégorie 2 dans le NAc et 3 dans le mPFC) ou encore Fos (catégorie 2 dans le mPFC et NAc) (Freeman et al., 2010). Les régulations génétiques induites par la consommation de cocaïne sont souvent associées à la stimulation des gènes de réponse précoce (c-Fos, ΔFosB, Zif268) ainsi qu'à la mise en jeu de facteurs de transcription (CREB et NFκB) (Nestler, 2012).

La consommation de cocaïne induit également des modifications à l'échelle morphologique des épines dendritiques. Il a été noté par de nombreux auteurs que la cocaïne augmente l'arbre dendritique notamment par le biais de mécanismes de synaptogénèse et de génération de synapses silencieuses, passant de 10 à 30%, dans le NAc (Dong, 2016). Des expériences *in vivo* chez le rat ont montré, par le biais d'enregistrements électrophysiologiques des courants postsynaptiques excitateurs (EPSC), une augmentation du taux de synapses silencieuses dans le NAc chez des animaux traités pendant 5 jours à la cocaïne (Huang et al., 2009). Ces auteurs ont également démontré que l'augmentation du taux de synapses silencieuses résultait d'une incorporation plus importante de NMDAR et donc d'une génération de nouvelles synapses induisant une augmentation de la densité dendritique. Dong et Nestler (2014) soutiennent l'hypothèse que la répétition des expositions à la cocaïne induit des mécanismes de plasticité normalement associés avec le développement, processus de synaptogénèse, au sein du système de récompense, qui seraient responsables du développement d'une mémoire particulièrement stable et robuste caractéristique de la dépendance. Cette idée est soutenue par le fait que la cocaïne augmente dans le NAc un grand nombre de substrats impliqués dans les mécanismes de synaptogénèse, dont NMDAR, CREB, NFκB ou encore ΔFosB (Dong and Nestler, 2014; Nestler, 2012). Ces nouvelles synapses formées par la cocaïne évoluent ensuite et deviennent matures par l'incorporation de AMPAR (Wright et al., 2020). De manière intéressante, bien que les projections provenant de l'amygdale basolatérale BLA ou du mPFC vers le NAc montrent une génération similaire de synapses, leur processus de maturation varie. En effet, les projections provenant de la BLA ou du cortex infralimbique (IL) du mPFC utilisent des CP-AMPA (AMPA perméable au Ca^{2+}), alors que les projections provenant du cortex prélimbique (PrL) du mPFC utilisent des AMPA imperméables au Ca^{2+} (Lee et al., 2013; Ma et al., 2014). Par ailleurs, ces synapses silencieuses générées par la cocaïne semblent jouer un rôle primordial dans l'incubation des indices associés à la cocaïne et dans le *craving* associé notamment pendant les périodes de sevrage. Des protocoles induisant une dépression à long terme (LTD) peuvent reverser la maturation de ces synapses. L'induction de LTD chez le rat dans les projections BLA-NAc (Lee et al., 2013) et PrL-NAc (Ma et al., 2014) altère l'incubation des indices associés au *craving* de la cocaïne. Enfin, une étude récente de Wright et coll. (2020) a montré, par le biais d'enregistrement électrophysiologique « minimal stimulation assay » et l'analyse morphologique des épines dendritiques « thin » *versus* « mushroom », que ces mêmes synapses silencieuses générées par la consommation de cocaïne, devenues matures au fil de plusieurs jours de sevrage, redevenaient silencieuses après la présentation des indices associés à la consommation de cocaïne. Ces auteurs ont démontré que ces processus étaient dirigés par l'adressage à la membrane puis l'internalisation des récepteurs CP-AMPA. Ces observations peuvent être mises en relation avec la théorie de la consolidation/reconsolidation (voir partie 3, Correia

et al., 2020) et avec l'idée que la dépendance est en partie soutenue par des souvenirs anormalement renforcés favorisant la consommation de drogue et le *craving* en période de sevrage. En effet, Wright et coll. (2020) font ainsi le parallèle entre l'état des synapses (« generation, maturation, re-silencing and re-maturation ») et les différents processus mnésiques (« encoding, consolidation, destabilization and reconsolidation »). L'impact de la cocaïne sur l'arborisation des dendrites représente donc une adaptation essentielle au développement de la dépendance.

Parmi les adaptations induites par la cocaïne, plusieurs auteurs s'accordent pour soutenir l'hypothèse que la consommation de cocaïne activerait des mécanismes neuroinflammatoires avec une augmentation des marqueurs impliqués dans les voies de la neuroinflammation observée dans des études chez l'Homme, le singe et le rongeur (Clark et al., 2013; Lacagnina et al., 2017; voir table 2 Correia et al., 2020).

2 La neuroinflammation

2.1 Qu'est-ce que la neuroinflammation ?

2.1.1 Principe

L'immunité innée est le premier système de défense de l'organisme contre les dangers exogènes et endogènes. Ce système agit dans tout l'organisme pour reconnaître et éliminer ces dangers notamment en mettant en œuvre des processus d'inflammations locaux (accroissement du débit sanguin, de la perméabilité vasculaire et de la migration des leucocytes) et systémiques (élévation de la température corporelle et mobilisation des réserves énergétiques) (Blais and Rivest, 2003).

Pendant longtemps, le système nerveux central (SNC) a été considéré comme un organe « immuno-privilegié » au sein duquel aucune réaction immunitaire n'avait lieu. Cette idée a longtemps été entretenue par l'observation que la barrière hémato-encéphalique (BHE) et ses jonctions serrées empêchaient la transmigration des cellules immunitaires de la périphérie au SNC. A la fin du 20^{ème} siècle, l'idée que le SNC aurait son propre système de défense d'immunité innée a émergé. Un système qui serait à la fois similaire à l'immunité innée périphérique, ou inflammation, avec le même langage par le biais de chimiokines et cytokines mais qui serait également suffisamment différent pour être nommé « neuro-inflammation » (Rivest, 2009). La neuroinflammation tout comme l'inflammation peut être déclenchée par plusieurs types de menaces : pathogènes exogènes ou signaux de dommages cellulaires internes. Dans le premier cas, il a été décrit que la réaction dans le SNC commencerait au

niveau des organes dépourvus de BHE, les organes circumventriculaires, puis qu'elle se propagerait dans le reste du SNC par le biais de molécules solubles, chimiokines et cytokines (Blais and Rivest, 2003). Dans le deuxième cas, la réaction peut être déclenchée directement au niveau du site de détection des dommages par un système de cellules et récepteurs de surveillance et reconnaissance (voir parties 2.1.2 et 2.1.3).

De plus, il est intéressant de noter la double nature de la neuroinflammation. Ainsi, cette réaction, au départ bénéfique car impliquée dans la défense de l'organisme, devient néfaste si prolongée, chronique et non-contrôlée (Renaud et al., 2015). Par ailleurs, il est important de différencier la réponse neuroinflammatoire en réponse à un danger, du rôle fonctionnel des différents intervenants de cette voie dans d'autres fonctions physiologiques (DiSabato et al., 2016). Par exemple, de nombreuses études ont décrit un rôle physiologique primordial des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β et IL-6) dans les processus de plasticité synaptique comme la potentialisation à long terme (LTP) et les processus de mémoire (voir partie 3.2 Correia et al., 2020).

2.1.2 *Les cellules impliquées*

La neuroinflammation se démarque de l'inflammation par la nature des cellules impliquées. Contrairement à la périphérie où des cellules spécifiques dites immunitaires sont à l'œuvre, toutes les cellules du SNC, quelle que soit leur identité, sont impliquées dans la régulation de la neuroinflammation (Renaud et al., 2015) : les cellules gliales (microglies, astrocytes et oligodendrocytes) mais aussi les neurones et les cellules épithéliales. En effet, toutes sont capables de reconnaître des motifs de dangers par le biais de différentes combinaisons de récepteurs spécifiques (voir partie 2.1.3) et sont capables de répondre à ces dangers en sécrétant les nombreuses molécules médiatrices de la neuroinflammation : cytokines, chimiokines et autres messagers (NO, prostaglandines et ROS). Tout d'abord, les microglies sont considérées comme étant les principales cellules de l'immunité dans le SNC car elles sont les macrophages résidents du SNC. En effet, elles dérivent de la migration de macrophages lors des étapes de développement précoce de l'embryon et ont ainsi gardé des propriétés similaires. Ces cellules ont un rôle principal de surveillance du parenchyme par le biais de leur morphologie en « étoile », leurs multiples branches peuvent ainsi changer rapidement de structuration et sonder leur environnement (Subramaniam and Federoff, 2017). Les microglies passeront alors d'un état de veille à un état activé en passant d'une morphologie en « étoile » à « amiboïde ». Cette transformation morphologique permet aux cellules de migrer plus facilement au sein du parenchyme et être ainsi mobilisées sur le lieu où est survenu le danger. Elles ont comme rôle d'éliminer le danger puis de favoriser le remodelage et la régénération des tissus endommagés. Parmi les autres cellules,

les astrocytes ont également plusieurs fonctions. D'une part, leur morphologie en « étoile » leur permet de participer à la formation de la *glia limitans* de la BHE et, d'autre part, ils participent également à la mise en place d'une réponse inflammatoire suite à leur activation et assistent la réponse microgliale en proliférant et sécrétant de nombreux facteurs pro-inflammatoires. Selon les conditions, les astrocytes vont également sécréter des facteurs neurotrophiques permettant de soutenir la remyélinisation et la survie des neurones (Kumar, 2019; Renaud et al., 2015). Les oligodendrocytes sont des cellules gliales essentielles à la fonction des neurones en permettant le développement et la survie des axones par la myélinisation. Les oligodendrocytes sont des cellules particulières, sensibles à la toxicité des signaux inflammatoires. Selon le contexte, leur activation entraînera un renforcement de la myélinisation des neurones ou leur propre apoptose (Kumar, 2019). Enfin, en ce qui concerne les neurones, ils vont de manière constitutive maintenir un milieu immunosuppresseur en sécrétant en continu des cytokines et chimiokines anti-inflammatoires et ainsi, en temps normal, tempérer les réponses de la microglie (Renaud et al., 2015). A noter que les neurones sécrètent également des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires, de manière aiguë, notamment pour les fonctions physiologiques de ces intervenants dans d'autres mécanismes (DiSabato et al., 2016).

2.1.3 Signalisation principale : les Toll-like receptors

Tous les types cellulaires du SNC participent à la neuroinflammation et expriment tous des combinaisons de récepteurs spécifiques de reconnaissance des motifs (« pattern recognition receptor » PRR). Les PRR reconnaissent différents motifs de danger dont les PAMP (« pathogen-associated molecular patterns ») et des DAMP (« danger-associated molecular patterns »). Les PRR les plus communs sont les membres de la famille des « Toll-Like receptor » (TLR) (Brown et al., 2011; Hanamsagar et al., 2012; Kumar, 2019; Rivest, 2009). Cette famille possède environ une douzaine de membres chez les mammifères, répondant tous à des stimuli particuliers (Brown et al., 2011):

- TLR2 se dimérise avec TLR1 et TLR6 et ces récepteurs ainsi associés peuvent reconnaître des peptidoglycane, lipopeptides ou lipoprotéines ;
- TLR3 reconnaît les ARN double sens des virus ;
- TLR4 reconnaît le LPS des bactéries Gram- et les éléments xénobiotiques ;
- TLR5 reconnaît les flagellines bactériennes ;
- TLR7 et TLR8 peuvent reconnaître les ARN simple brins et les imidazoquinolines ;
- TLR9 reconnaît les ADN bactériens ou viraux.

La famille des TLR est caractérisée par une structure de protéines membranaires constituées d'un ectodomaine riche en répétitions en leucine, d'une région transmembranaire et d'une partie cytoplasmique contenant un domaine d'homologie Toll/IL1R (TIR). Alors que les TLR2/1, 2/6, 4 et 5 sont localisés sur les membranes extérieures des cellules, les TLR7, 8 et 9 sont localisés sur les endosomes (Kumar, 2019). Chaque type cellulaire exprime des combinaisons différentes de ces récepteurs. Ainsi les microglies expriment TLR1, 2, 3, 4, 5, 7, 8 et 9, les astrocytes expriment les TLR2, 3, 4 et 9, les oligodendrocytes expriment les TLR2 et 3 et les neurones expriment les TLR2, 3, 4 et 6 (Kumar, 2019).

La stimulation de tous ces récepteurs, à l'exception du TLR3, stimule la même voie de signalisation (**Figure 5**, Brown et al., 2011).

Par le biais de leur domaine TIR, ils interagissent avec MyD88 (myeloid differentiation factor 88) qui une fois activé s'associe à IRAK (IL1R-associated kinase). IRAK va ensuite activer TRAF6 (TNF α receptor-associated factor) qui lui-même va permettre l'activation des IKK. L'activation des IKK permet l'activation du facteur de transcription NF κ B (voir partie 2.2.1). Ce facteur de transcription a un rôle central dans la signalisation inflammatoire et neuroinflammatoire et induit l'expression de cytokines et chimiokines pro- et anti-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, TNF α ou encore IFN de type II). Les cytokines IL-1 β et TNF α sécrétées vont par la suite stimuler leur propre récepteur, IL1R et TNFR, qui eux-mêmes stimulent la voie du NF κ B induisant ainsi une amplification de la réponse.

De son côté, le TLR3 permet la stimulation d'une voie indépendante de MyD88. Cette voie active la protéine TRIF (Toll interleukin receptor-domain-containing adapter-inducing interferon β) qui va activer TRAF3 ou TRAF6. TRAF6 entrainera la même voie de signalisation décrite précédemment, alors que TRAF3 induira l'activation de IRF3 permettant l'augmentation de l'expression de cytokines anti- et pro-inflammatoires (IL-10 et IFN de type I). A noter que le TLR4 par le biais d'une protéine adaptatrice TRAM (TRIF-related adaptor molecule) peut lui aussi stimuler la voie TRIF/TRAF3.

Enfin, les voies MyD88/IRAK/TRAF6 et TRIF/TRAF3 permettent également l'activation des voies MAPK, dont ERK, p38 et JNK activant le facteur de transcription AP1 (AP1 venant de la dimérisation c-fos/c-jun).

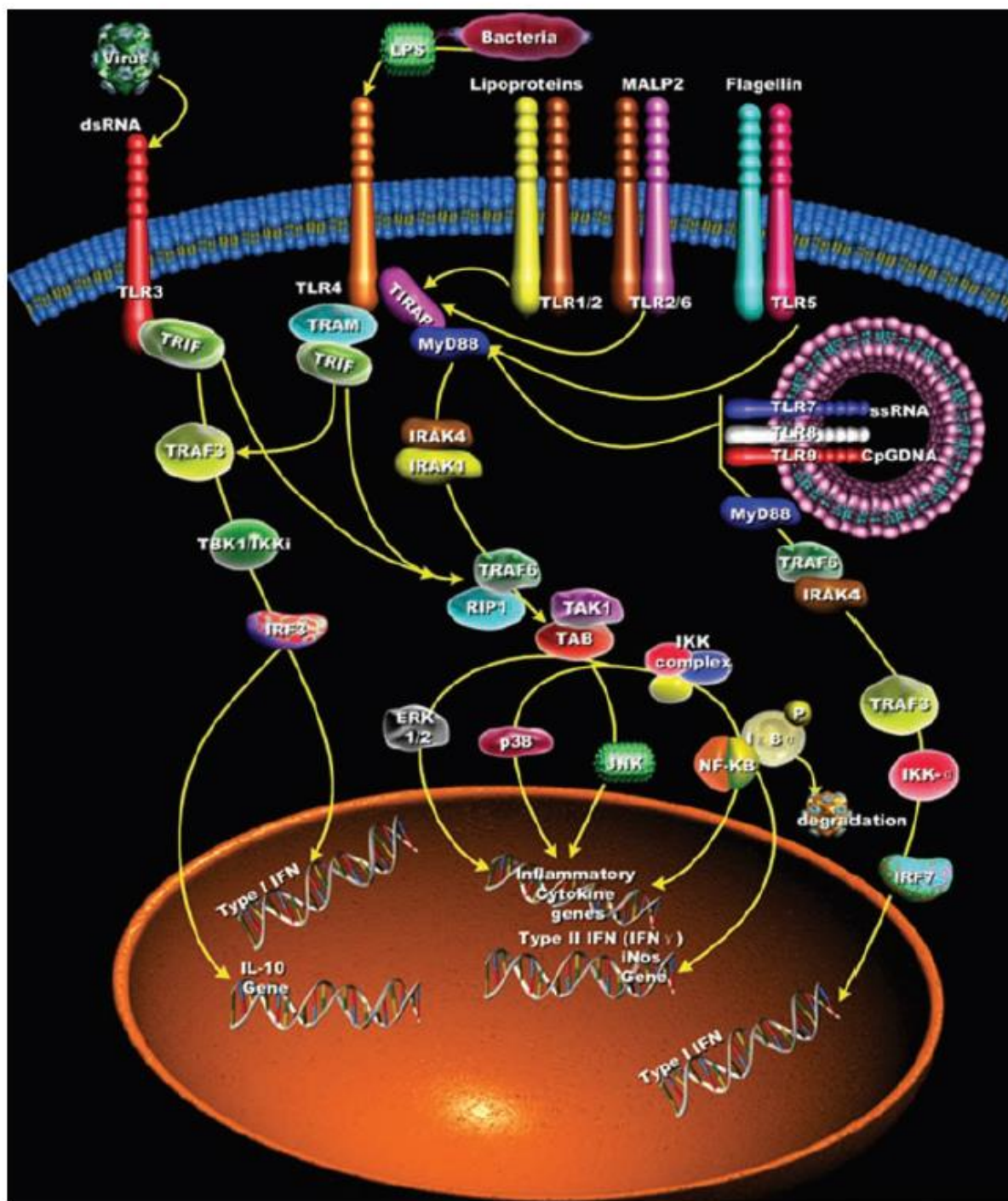


Figure 5 : Voies de signalisation des TLR (image issue de Brown et al., 2011). *IKK* : *I κ B* kinase, *IRAK* : *IL1R*-associated kinase, *IRF* : interferon regulatory factors, *JNK* : *cJun* amino terminal kinase, *LPS* : lipopolysaccharide, *MyD88* : myeloid differentiation factor 88, *TAB* : *TAK1*-binding protein, *TAK* : *TGF- β* -activated kinase, *TBK* : *TANK*-binding kinase, *TIR* : *Toll/IL1* homology domain, *TLR* : *Toll*-like receptor, *TRAF* : *TNF α* receptor-associated factor, *TRAM* : *TRIF*-related adaptor molecule, *TRIF* : *Toll* interleukin receptor-domain-containing adapter-inducing interferon β

2.2 Le facteur de transcription : NFκB

2.2.1 Pourquoi s'intéresser à NFκB ?

Le facteur de transcription NFκB ou « nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells » a été découvert en 1986 (Sen and Baltimore, 1986) et a depuis été impliqué dans de nombreuses fonctions. En effet, le facteur NFκB est ubiquitaire dans tous les types cellulaires du SNC (Hayden and Ghosh, 2004; Oeckinghaus and Ghosh, 2009; Wan and Lenardo, 2009). Il a un rôle central dans les voies de signalisation neuroinflammatoires (Lawrence, 2009) mais aussi dans de multiples fonctions physiologiques : apoptose/survie cellulaire, apprentissage et mémoire, ou encore de plasticité synaptique (Mattson, 2005; Meffert and Baltimore, 2005; Nennig and Schank, 2017; Salles et al., 2014). De plus, plusieurs études ont démontré une implication de ce facteur dans la consommation de cocaïne. Chez l'Homme, une étude génomique chez des patients cocaïnomanes a mis en lumière la présence d'un polymorphisme de vulnérabilité au niveau du gène *nfkb1* codant pour NFκBp105 (Levrant et al., 2015). Chez l'animal, l'administration passive aiguë ou chronique de cocaïne augmente les taux de NFκBp105 et p65 au niveau du NAc (Ang et al., 2001). Le facteur NFκB est également nécessaire à l'augmentation des épines dendritiques induite par la cocaïne au niveau du NAc (Russo et al., 2009). Le rôle exact du NFκB dans la consommation de cocaïne est néanmoins encore peu exploré. Enfin, mon projet de thèse s'est intéressé à ce facteur de transcription dans le comportement d'auto-administration de cocaïne, car des études précédemment conduites au laboratoire ont démontré, par le biais d'une analyse du méthylome, que l'auto-administration de cocaïne modulait différemment la méthylation et l'expression de nombreux gènes dont les voies de signalisation sont centrées autour du NFκB (voir partie 1.3.4, Fonteneau et al., 2017).

2.2.2 La voie de signalisation de NFκB

A l'état basal, le facteur de transcription NFκB est surtout présent dans le cytoplasme des cellules. Ce facteur permet ainsi une réponse inductible et rapide sans synthèse préalable de nouvelles protéines. Le NFκB est maintenu dans le cytoplasme inactivé par la protéine répressive, IκB.

Le NFκB peut être activé par la stimulation de très nombreuses voies en amont (**Figure 7**, Hayden and Ghosh, 2004). Toutes ces voies vont à terme permettre l'activation du complexe kinase IKK. L'activation de ce complexe va permettre la phosphorylation des IκB entraînant leur ubiquitination et leur dégradation. La dégradation d'IκB libère le dimère NFκB qui peut lui-même être phosphorylé ou/et acétylé, permettant à terme son activation et sa translocation nucléaire par le biais de sa sé-

quence NLS (nuclear localization sequence), découverte en l'absence de I κ B. Une fois dans le noyau, le dimère NF κ B peut alors se fixer sur les séquences κ B et activer ou non la transcription de ces gènes cibles. Selon, les sous-unités qui composent le dimère, NF κ B n'aura pas la même fonction transcriptionnelle (Wan and Lenardo, 2009). Par exemple, les homodimères NF κ Bp50/p50 sont répresseurs car p50 ne contient pas de domaine « transcription activation domain » (TAD) et ne peuvent donc pas activer la transcription des gènes cibles.

La voie de signalisation met donc en jeu trois familles de protéines différentes :

* La famille Rel

NF κ B est un terme global pour une famille de facteurs de transcription. En effet, ce facteur de transcription est toujours retrouvé sous forme d'hétérodimères ou d'homodimères avec de nombreuses combinaisons parmi 5 sous-unités possibles (p65=RelA, p50, p52, RelB et cRel). Ces sous-unités font partie de la famille des protéines Rel et présentent de nombreuses homologues (**Figure 6**). Elles possèdent toutes, au niveau de leur N-ter, un « Rel Homology Domain » (RHD) d'environ 300a.a., qui régule la dimérisation des sous-unités, la fixation à l'ADN, la localisation nucléaire et la rétention cytoplasmique par son inhibiteur. En revanche, seuls NF κ Bp65, cRel et RelB possèdent au niveau de leur C-ter un TAD, ainsi seules les combinaisons contenant l'une de ces trois sous-unités pourront avoir une fonction d'activateur de la transcription. A noter que la combinaison NF κ Bp50/p65 est la plus courante et de ce fait la plus étudiée (Oeckinghaus and Ghosh, 2009; Wan and Lenardo, 2009).

* La famille I κ B

La famille des protéines I κ B est constituée de plusieurs membres (**Figure 6**) qui présentent tous un domaine de répétitions d'ankyrine. Les précurseurs de NF κ Bp50 et p52, p105 et p100, sont aussi considérés comme faisant partie de cette famille. En effet, il a été observé que des protéines p100 non transformées en p52 pouvaient se fixer au dimère de NF κ B et agir comme les I κ B (Mitchell et al., 2016). Les I κ B agissent en se fixant au niveau des RHD des dimères de NF κ B. Ils couvrent ainsi la séquence NLS empêchant la translocation nucléaire du facteur de transcription et en le maintenant ainsi dans le cytoplasme. Le NF κ B maintenu ainsi dans le cytoplasme ne peut donc pas avoir son action de facteur de transcription.

* Le complexe IKK

Le complexe kinase IKK (I κ B kinase) est constitué de trois sous-unités (**Figure 6**), dont deux fonctionnelles contenant des domaines kinase (IKK α et IKK β) et une régulatrice (IKK γ pour la voie classique et NIK pour la voie alternative, **Figure 7A**). L'activation d'IKK permet la phosphorylation d'I κ B au niveau de résidus particuliers (Ser-32 et Ser-36 d'I κ B α). Cette phosphorylation est ensuite l'élément déclencheur permettant l'ubiquitination et la dégradation par le protéasome 26S de l'I κ B. La dégradation d'I κ B permet la libération du dimère NF κ B de son inhibiteur (Oeckinghaus and Ghosh, 2009; Wan and Lenardo, 2009).

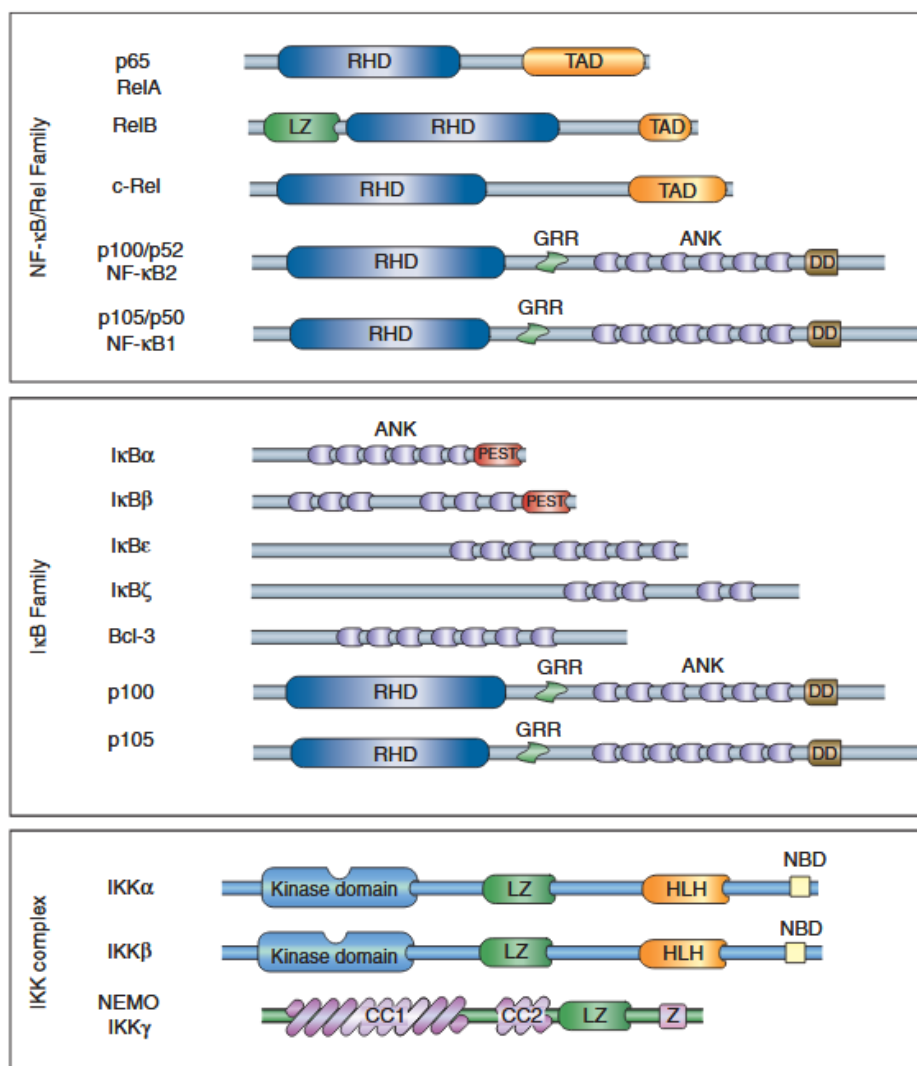


Figure 6 : Les différents membres de la voie NF κ B (image issue de (Oeckinghaus and Ghosh, 2009). ANK : ankyrin repeats, Bcl-3 : B-cell lymphoma 3- encoded protein, CC : coiled-coil, DD : death domain, GRR : glycine-rich region, HLH : helix-loop-helix, IKK : I κ B kinase, I κ B : inhibitory κ B, LZ : leucine-zipper, NBD : NEMO binding domain, NEMO : NF κ B essential modulator, PEST : proline-, glutamic acid-, serine-, and threonine-rich region, RHD : Rel homology domain, TAD : transactivation domain

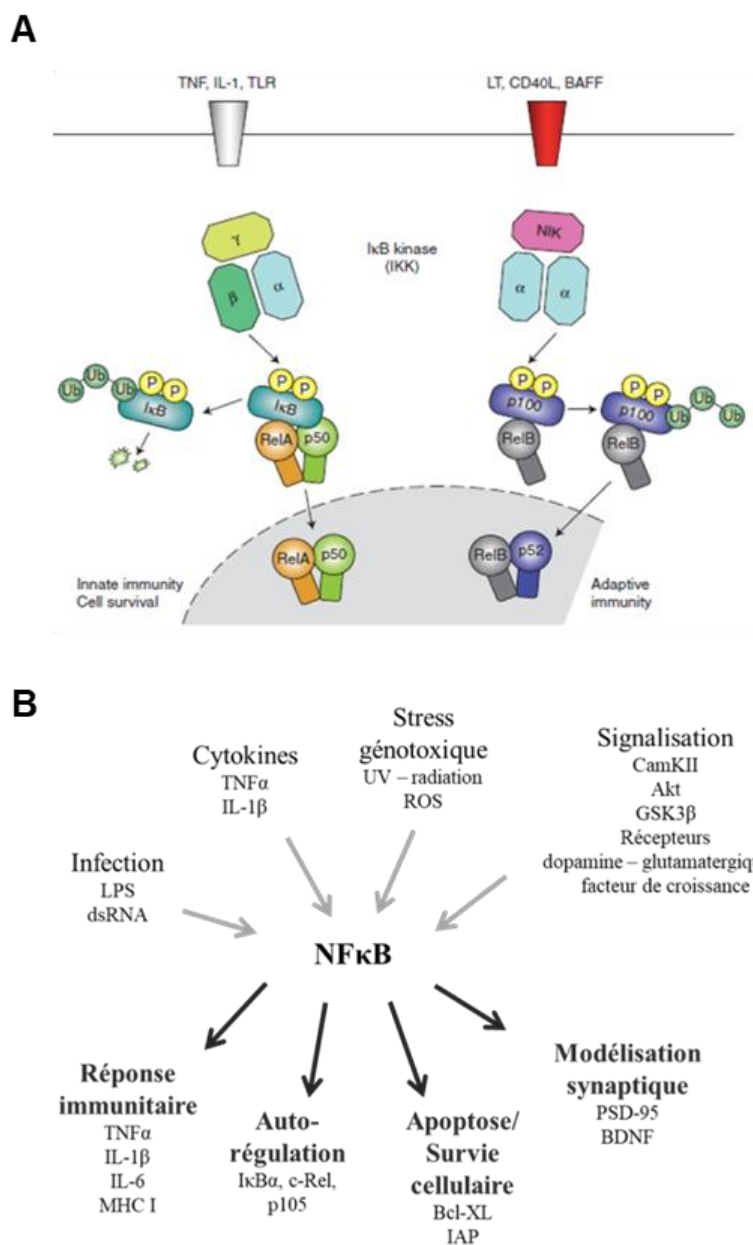


Figure 7 : A. La voie d'activation du NFκB (image issue de Lawrence, 2009) **B. Exemples de voies en amont et en aval de NFκB** (image modifiée de Oeckinghaus and Ghosh, 2009). *Akt* : *serine/threonine-specific protein kinase* , *BAFF* : *B-cell activating factor*, *Bcl* : *B-cell lymphoma encoded protein*, *BDNF* : *Brain-derived neurotrophic factor*, *CD40L* : *cluster of differentiation 40 ligand*, *GSK3β* : *glycogen synthase kinase-3*, *IAP* : *Inhibitors of apoptosis proteins*, *IKK* : *IκB kinase*, *IL-1/6* : *interleukine-1/6*, *IκB* : *inhibitory κB*, *LPS* : *lipopolysaccharide*, *LT* : *lymphotoxin*, *MHC I* : *major histocompatibility complex type I*, *NIK* : *NFκB -inducing kinase*, *PSD-95* : *postsynaptic density protein 95*, *ROS* : *reactive oxygen species*, *TLR* : *Toll-like receptor*, *TNF* : *tumor necrosis factor*

Ce facteur peut réguler de très nombreux gènes. Il se fixe sur l'ADN au niveau des séquences consensus appelées site κ B : 5'-GGGRNYYYCC-3' (où R=purine, Y=pyrimidine et N=nucléotide). De nombreuses études ont permis de détailler une liste de gènes cibles et englobant un très large spectre de fonction (<https://www.bu.edu/nf-kb/gene-resources/target-genes/>, et voir **Figure 7B** pour quelques exemples). Parmi ces gènes, on retrouve les gènes de cytokines/chimiokines (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IFN γ , CCL5...), de molécules impliquées dans l'immunité (MHC I, TLR2, TLR9, TNFR...), de réponse au stress (COX-2, SOD1, SOD2...), de récepteurs membranaires (mGlu2, NMDAR2A, α 2B-ADR, MOR...), de régulateur de l'apoptose (Bcl-2, Bax, IAP...), de facteurs de croissance (BDNF, M-CSF, NGF, VEGF...) ou encore de facteurs de transcription (c-fos, c-rel, E2F3a, I κ B α , junB, nfkb1, nfkb2, relB, Sox9...). Il apparaît ainsi que le NF κ B a un rôle central dans de nombreux processus biologiques.

3 La neuroinflammation induite par la cocaïne peut-elle expliquer la mémoire et l'apprentissage inadaptés associés à la prise de cocaïne ?

3.1 La dépendance : une pathologie mnésique ?

Il est reconnu depuis de nombreuses années que l'environnement dans lequel un individu consomme une substance psychoactive est associé à la consommation elle-même (Deroche-Gamonet et al., 2002). Ce contexte et ces indices acquièrent alors une fonction prédictive de l'effet de la substance et augmentent ainsi le risque du sujet à consommer (ou reprendre une consommation) quand il y est exposé. L'un des facteurs permettant la progression et/ou le maintien de la pathologie serait le renforcement du souvenir lié à l'expérience « plaisante » procurée par la substance (Everitt, 2014). Certains auteurs considèrent ainsi que la dépendance serait, au moins en partie, sous-tendue par des processus mnésiques de consolidation/reconsolidation entraînant la perpétuation de la consommation (Tronson and Taylor, 2007).

La consolidation et la reconsolidation sont des processus qui surviennent immédiatement après le vécu d'un événement dans le but de stocker ou restocker celui-ci dans la mémoire de l'individu. La consolidation intervient suite à la première survenue de l'événement, alors que la reconsolidation intervient suite au rappel de cet événement. Ces processus permettent ainsi de stabiliser le souvenir de l'événement. Selon la théorie de la reconsolidation, la mémoire se trouverait dans un état labile lorsqu'elle est rappelée et donc vraisemblablement modifiable. Ainsi, l'idée d'intervenir sur la reconsolidation de la mémoire associée à la prise de cocaïne a émergé comme une stratégie thérapeutique

envisageable dans le but de diminuer la force des souvenirs associant les effets renforçateurs et les indices de l'environnement (**Figure 8**, Bender and Torregrossa, 2020).

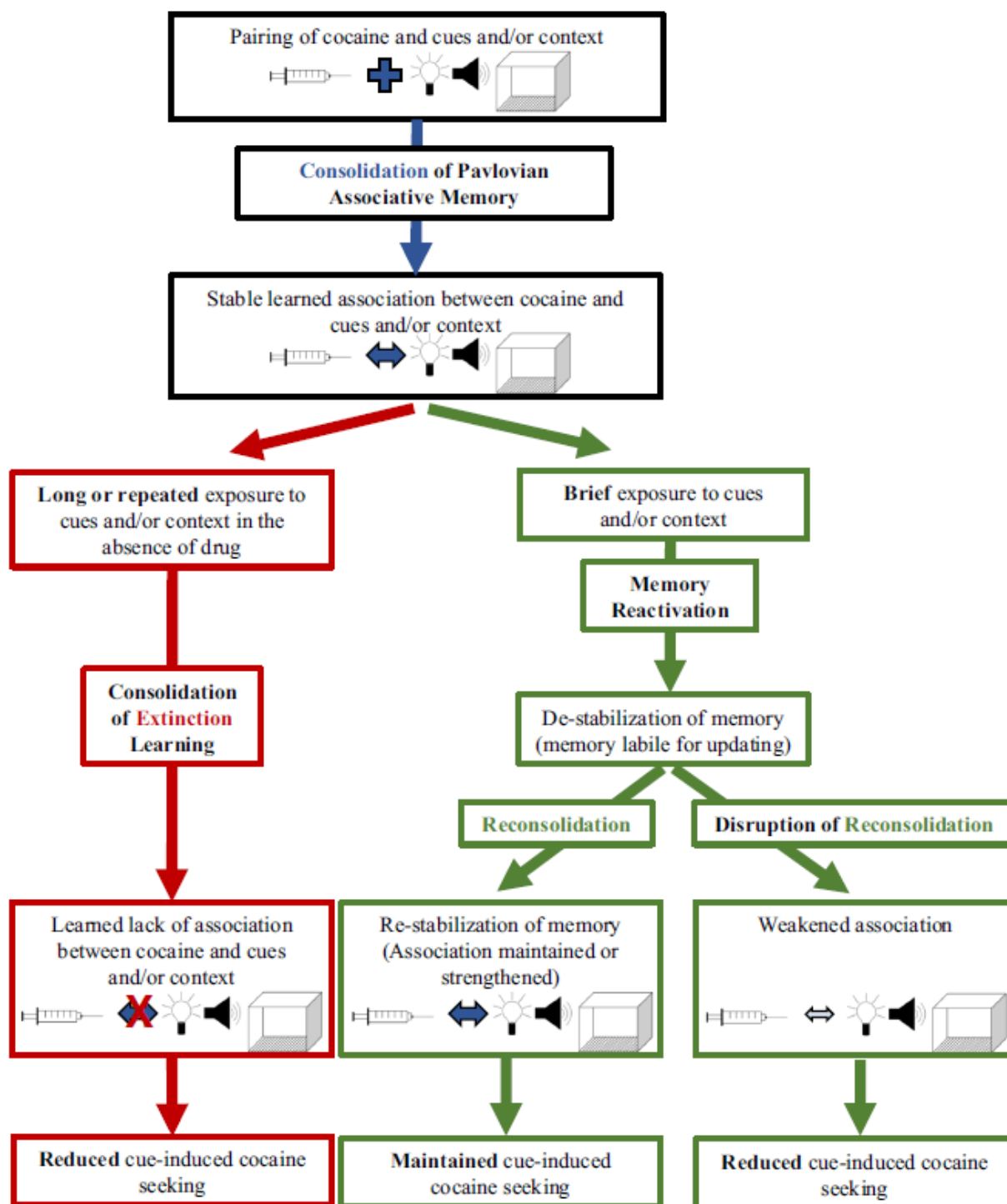


Figure 8 : Processus de consolidation (bleu), reconsolidation (vert) et extinction (rouge) et des possibilités d'interventions (image issue de Bender and Torregrossa, 2020)

3.2 Revue : Can cocaine-induced neuroinflammation explain maladaptive cocaine-associated memories ? (Correia et al., 2020)

Au cours de ma deuxième année de thèse, lors d'un séjour de 2 mois au sein du laboratoire du Pr. Mary C. Olmstead à Kingston au Canada, j'ai amorcé l'écriture d'une revue sur la possibilité d'une contribution de la neuroinflammation dans les altérations induites par la prise de cocaïne.

Dans un premier volet, la revue résume les données de la littérature concernant les théories de la mémoire appliquée à la prise de cocaïne. En particulier, nous avons regroupés l'ensemble des facteurs moléculaires décrits dans ces processus. Nous avons ensuite détaillé les données qui décrivent l'implication des facteurs neuroinflammatoires dans les processus de mémoire. Enfin, la revue récapitule également les données démontrant la mise en jeu des facteurs neuroinflammatoires dans la prise de cocaïne. Ainsi, nous proposons une discussion sur la contribution d'un état neuroinflammatoire induit par la prise de cocaïne, et son implication fonctionnelle dans la mise en place de la dépendance à la cocaïne. Nous proposons l'hypothèse selon laquelle l'augmentation de l'expression de certains de ces facteurs est impliquée dans la mémoire inadaptée observée après la prise de cocaïne. Cette revue de questions a représenté un gros travail de recherche bibliographique et m'a permis de mieux cibler mes questions pour la partie expérimentale de ma recherche. Cette revue a été publiée en janvier 2020 et est présentée ci-après.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Neuroscience and Biobehavioral Reviews

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neubiorev

Review article

Can cocaine-induced neuroinflammation explain maladaptive cocaine-associated memories?

Caroline Correia^a, Pascal Romieu^a, Mary C. Olmstead^b, Katia Befort^{a,*}^a Université de Strasbourg, Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives (LNCA), Centre de la Recherche Nationale Scientifique, UMR 7364, Faculté de Psychologie, 12 rue Goethe, F-67000, Strasbourg, France^b Dept. Psychology, Centre for Neuroscience Studies, Queen's University, Kingston ON, K7L 3N6, Canada

ARTICLE INFO

Keywords:

Cocaine
Addiction
Neuroinflammation
Reconsolidation
Memory

ABSTRACT

Persistent and intrusive memories define a number of psychiatric disorders, including posttraumatic stress disorder and substance use disorder. In the latter, memory for drug-paired cues plays a critical role in sustaining compulsive drug use as these are potent triggers of relapse. As with many drugs, cocaine-cue associated memory is strengthened across presentations as cues become reliable predictors of drug availability. Recently, the targeting of cocaine-associated memory through disruption of the reconsolidation process has emerged as a potential therapeutic strategy; reconsolidation reflects the active process by which memory is re-stabilized after retrieval. In addition, a separate line of work reveals that neuroinflammatory markers, regulated by cocaine intake, play a role in memory processes. Our review brings these two literatures together by summarizing recent findings on cocaine-associated reconsolidation and cocaine-induced neuroinflammation. We discuss the interactions between reconsolidation processes and neuroinflammation following cocaine use, concluding with a new perspective on treatment to decrease risk of relapse to cocaine use.

1. Introduction

Drug addiction is a worldwide health problem and a primary risk factor for a variety of medical conditions. For example, cocaine use increases the risk of myocardial infarction by 24 times, and induces convulsions in 1–10% of users. Cocaine abuse is comorbid with other psychiatric disorders, with 24 % of cocaine users reporting an anxiety disorder (OFDT, 2012). Among addictive drugs, cocaine is the most commonly consumed illicit psychostimulant in the world: 18 million people worldwide have used cocaine, among which approximately 400 000 have a cocaine use disorder (World Drug Report, 2018). The

powerful reinforcing properties of cocaine lead to escalation of intake and loss of control over consumption, producing compulsive drug seeking and drug taking despite obvious negative consequences. Importantly, cocaine abuse is characterized by a high vulnerability to chronic relapse (Koob and Volkow, 2016), which explains its resistance to treatment and perpetuation of maladaptive behavior.

Cocaine, like others drugs of abuse, directly or indirectly impacts the mesocorticolimbic pathway, leading to enhancement of dopamine (DA) neurotransmission from the ventral tegmental area (VTA) to the nucleus accumbens (NAc) (Di Chiara and Imperato, 1988). This “reward pathway” mediates the reinforcing effects of natural reinforcers

Abbreviations: ADAMs, a disintegrin and metalloproteinase; AMPAR, AMPA receptor; BLA, basolateral amygdala; CaMKII, calcium/calmodulin-dependent protein kinase II; CB2R, cannabinoid 2 receptor; Cdk5, cyclin dependent kinase 5; CNS, central nervous system; CPP, conditioned place preference; CPu, caudate putamen; CS, conditioned stimulus; DA, dopamine; DAMPs, danger-associated molecular patterns; DH, dorsal hippocampus; eIF2 α , eukaryotic initiation factor 2 α ; ERK, extracellular signal-regulated kinase; GPCRs, G protein coupled receptor; HAT, histone acetyltransferase; IFN γ , interferon γ ; IL-1, interleukin-1; IL-1ra, IL-1 receptor antagonist; IL-1 β , interleukin 1 β ; IL-6, interleukin 6; iNOS, inducible nitric oxide synthase; IRAK1, IL-1R-associated kinase 1; IRF3, interferon regulatory factor 3; JNK, c-Jun N-terminal kinases; LPS, lipopolysaccharide; LTD, long-term depression; LTM, long-term memory; LTP, long-term potentiation; MAPK, mitogen-associated protein kinase; MCSF, macrophage colony-stimulating factor; MD2, myeloid differentiation protein 2; MMPs, matrix metalloproteinases; mPFC, medial prefrontal cortex; mTOR, mammalian target of rapamycin; MyD88, myeloid differentiation primary response 88; NAc, nucleus accumbens; NCAM, neural cell adhesion molecule; NF κ B, nuclear factor-kappa B; NMDARs, NMDA receptor; PAMPs, pathogen-associated molecular patterns; PDGFs, platelet-derived growth factor; PET, positron emission tomography; PKA, protein kinase A; PRR, pattern recognition receptor; PSD95, postsynaptic density protein 95; PTSD, posttraumatic stress disorder; SA, self-administration; STM, short-term memory; TLR, Toll-like receptor; TNFR, TNF receptor; TNF α , tumor necrosis factor α ; TRAM, TRIF-related adaptor molecule; TRIF, Toll interleukin receptor-domain-containing adapter-inducing interferon- β ; US, unconditioned stimulus; VTA, ventral tegmental area

* Corresponding author.

E-mail address: katia.befort@unistra.fr (K. Befort).<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.01.001>

Received 2 October 2019; Received in revised form 20 December 2019; Accepted 1 January 2020

Available online 11 January 2020

0149-7634/ © 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

that have evolutionary significance (e.g., food, mating). The critical role of DA in this pathway may involve one or more processes, such as associative learning (Corbit and Balleine, 2016), error prediction (i.e., relationship between expected and actual outcomes) (Schultz, 2016), and motivation (Salamone et al., 2016). Regardless of the precise process, there is general agreement that drugs of abuse, such as cocaine, hijack this system, increasing DA neurotransmission that results in strengthened reinforcement (Chen et al., 2008; Bamford et al., 2018).

The reinforcing effect of cocaine depends on both instrumental and classical conditioning. The former occurs as individuals learn the relationship between drug intake and drug effects, including the consequences of drug administration on alleviating withdrawal (for a discussion on the relative contributions of positive versus negative reinforcement in addiction, see review Wise and Koob, 2014); the latter when environmental cues become associated with drug intake (Wikler and Pescor, 1967; Tiffany, 1990). With classical conditioning, drug-paired cues acquire characteristics predicting drug availability, including DA release in the striatum (Ito et al., 2002). In rodents, these conditioned cues, previously associated with cocaine consumption, can then become conditioned reinforcers and induce drug-seeking behavior, even after a long period of abstinence (Grimm et al., 2001). Enhanced drug-seeking can be observed even when animals have to override aversive stimuli such as electric shock (Saunders et al., 2013). Unfortunately, no effective treatments have been found to efficiently reduce rates of relapse, and it has been hypothesized that an association between environmental cues and pharmacological effects of cocaine, strongly anchored in memory, is part of the problem (Hyman et al., 2006). This has stimulated a new direction in addiction research, targeting memory processes, particularly when they are reactivated, in order to weaken memories associated with cocaine and, thereby, decrease the risk of relapse (Torregrossa and Taylor, 2016).

In that respect, neuroinflammation may be an interesting target as numerous studies have linked neuroinflammatory markers to memory processes (see review Bader and Winklhofer, 2019). In addition, both human and animal studies reveal an association between chronic cocaine consumption and the upregulation of several neuroinflammatory markers (see review Clark et al., 2013). The present review aims to discuss the hypothesis that cocaine addiction results, at least in part, from an involvement of traditional neuroinflammatory pathways in memory processes. We summarize evidence that neuroinflammatory cytokines have a dual function in memory, and that cocaine intake can increase release of these cytokines. Finally, we propose that altered memory processes observed in cocaine addiction may result from neuroinflammatory mechanisms.

2. Memory

2.1. Memory: general process

Memory is the mental process of acquiring, retaining and retrieving information. It is critical for cognitive processes, such as language, decision making, and spatial navigation. Memory is a time-dependent process with three phases: encoding, storage, and retrieval. Gold and McGaugh's (1975) single-trace theory hypothesized that each new event triggers a short-term memory (STM), which either fades or is encoded and stored in long-term memory (LTM) through an active process. Whether a memory moves into LTM or not depends on factors such as repetition and the attentional state of the individual. The idea that memory storage is an active process was established by several pioneering studies demonstrating that memory retention could be disrupted after post-learning manipulations (e.g., electroconvulsion or protein synthesis inhibition) (Grecksch and Matthies, 1980). This active process allows a labile memory trace to transition to a stable and fixed form. Following this initial work, Misanin et al. (1968) showed that old memories that are retrieved could also be disrupted by a post-activation manipulation (e.g., electroconvulsion). This study introduced

the idea that memory may always be in one of two forms: active memory describes newly acquired memories as well as older, re-activated memories, whereas inactive memory corresponds to stored memories (Lewis, 1979). In other words, the process by which memory is retained in LTM indefinitely is not passive; rather, this is a flexible process within which memory can be modified and updated over time.

2.2. Consolidation and reconsolidation

The consolidation/reconsolidation theory emerged to describe the two processes in which memory switches from active to inactive forms (Lewis, 1979). Consolidation corresponds to the storage of a new memory whereas reconsolidation corresponds to the storage of a re-activated memory (i.e., previously-acquired memories that are retrieved). Some of the earliest studies on memory consolidation highlighted a time and protein synthesis dependent mechanism. Indeed, increasing the delay between memory formation and a subsequent manipulation produced a predictable degradation of amnesia: memory was impaired when a disruption was induced up to 6 h after learning (Kopp et al., 1966). A protein synthesis dependent mechanism of consolidation was revealed in 1968, with evidence that cycloheximide (a protein synthesis inhibitor) induces memory impairment when administered 3 h after learning (Barondes and Cohen, 1968), suggesting that the manipulation did not impact STM, but altered memory retention through LTM. In another study, protein synthesis inhibition disturbed avoidance conditioning when it was administered 10 min prior to or 80, 240 and 360 min after training, but not when administered 45 and 165 min after training (Grecksch and Matthies, 1980). This suggested that there are two phases of memory that are dependent on protein synthesis. Taken together, these results support the consolidation theory by showing that memory can be modified during a period following its formation and is then sustained by *de novo* protein synthesis.

In addition to consolidation processes, memory reactivation by retrieval also leads to a period of instability (a few hours) in which memory is labile (Misanin et al., 1968). Reconsolidation is necessary to restabilize the memory into an inactive form so that it may be stored and maintained across time. Reconsolidation provides a mechanism for updating memories over time, a process that provides an evolutionary advantage to organisms by facilitating behavioral flexibility.

After a twenty-year hiatus, Nader et al. (2000) revived research on consolidation and reconsolidation using a fear conditioning paradigm. In simple consolidation experiments, rats experience a tone (conditioned stimulus, CS) followed by a shock (unconditioned stimulus, US); the next day, they freeze in response to the tone. Administration of a protein synthesis inhibitor (anisomycin) up to 3 h following the CS-US pairing, prevents the freezing response to the CS on the next day. Nader and colleagues extended this principle to reconsolidation showing that protein synthesis inhibition also disrupts post-retrieval modification of the CS-US association; administration of anisomycin following CS-induced freezing eliminates conditioned responses on a subsequent test day. In other words, memory of the CS-US association is altered following its retrieval, verifying that reconsolidation is an active process during which previously-acquired memories are labile. This process appears to be shared by many species (Nader and Hardt, 2009) and is associated with specific neural sites in the mammalian brain, such as the amygdala or nucleus accumbens (Nader et al., 2000; Fuchs et al., 2009; Torregrossa et al., 2010; Théberge et al., 2010; Arguello et al., 2014). A consolidation/reconsolidation description of memory is supported by evidence that both processes involve molecular and cellular mechanisms that underlie synaptic plasticity, such as long-term potentiation (LTP) (Lynch, 2004). LTP is a cellular mechanism characterized by an increase in post-synaptic neuronal responses after brief high-frequency stimulation (Nicoll, 2017). It is considered one of the cellular bases underlying learning and memory, particularly as it matches Hebbian learning rules. LTP is described as a two-phase process,

Table 1
Summary of research findings on cocaine-associated reconsolidation.

Focus	Species	Paradigm	Pre-manipulation	Manipulation	Pharmacological/Behavioral intervention	Site of intervention	Test	Effect	Reference
Conditioning	Rat	CPP (10 mg/kg)	None	Context reactivation, Drug-paired compartment, 3 min, 1x or 5x	Context-extinction, All compartments, 15 min, 5x Reconditioning, Drug-paired compartment, 30 min, 1x	None	Cocaine priming test 2 Test 2	- +	Sartor and Aston-Jones, 2014
	Mouse	CPP (15 mg/kg)	None	Context reactivation, Drug-paired compartment, 4 min, 4x	Counterconditioning, Lithium chloride (LiCl)-induced malaise (150 mg/kg, i.p.), Drug-paired compartment, 4x	Systemic	Cocaine priming test 2	-	Golseker et al., 2017
Protein synthesis	Rat	SA (0.5 mg/kg)	Extinction	Cue reactivation, Contexte B, 3x	Cycloheximide	Systemic	Cue-induced reinstatement	-	Dunbar and Taylor, 2016
	Rat	SA (0.5 mg/kg)	Extinction Forced abstinence	Cocaine (10 mg/kg, i.p.) + Cue (contingents) reactivation, Contexte A, 5 min	Anisomycin	mPFC	Cue-induced reinstatement	- 0	Sorg et al., 2015
	Rat	SA (0.2 mg/inj)	Extinction, Context B	Context reactivation, Context A, 15 min	Anisomycin	DH, dmPFC or dICPu	Context-induced reinstatement	0	Ramirez et al., 2009
	Rat	SA (0.10 mg/inj)	Extinction, Context B	Context reactivation, Context A, 15/60min	Anisomycin Anisomycin	BLA pCPU	Context-induced reinstatement	- 0	Fuchs et al., 2009
	Rat	SA (0.15 mg/kg)	Extinction, Context B	Context reactivation, Context A, 15 min	Anisomycin (BLA) + muscimol/baclofen (DH)	BLA + DH	Context-induced reinstatement	-	Wells et al., 2011
	Mouse	CPP (15 mg/kg)	None	Cocaine (1.5 mg/kg, i.p.) reactivation, HC Context reactivation, all compartments, 5 min Cocaine (1.5 mg/kg, i.p.) reactivation, HC Context reactivation, all compartments, 5 min	Cycloheximide	Systemic	Test 2 Cocaine priming test 2	- 0	Zhu et al., 2018a

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Focus	Species	Paradigm	Pre-manipulation	Manipulation	Pharmacological/Behavioral intervention	Site of intervention	Test	Effect	Reference
Learning mechanism	Rat	SA (1.0 mg/kg)	Extinction	Cue reactivation, Context B, 3x Cue extinction, Context B, 60/120x	KN-62 KN-62	BLA	Cue-induced reinstatement	- +	Rich et al., 2016
	Rat	SA (0.5 mg/kg)	Extinction	Cue reactivation, Context B, 3x	Rp-cAMPS	BLA	Cue-induced reinstatement Cocaine-induced reinstatement	- o	Sanchez et al., 2010
	Rat	SA (1 mg/kg)	Extinction	Cue reactivation, context B, 3x Cue extinction, Context B, 120x Cue reactivation, Context B, 3x	8-CPT 6-Bnz	BLA	Cue-induced reinstatement	- o	Wan et al., 2014
	Rat	SA (0.25 mg/kg)	Forced abstinence	Cue reactivation, Context A, 30x	Zif268 ASO	BLA	Cue-induced reinstatement	-	Lee et al., 2006
	Rat	SA (0.25 mg/kg)	Forced abstinence	Cue reactivation, Context A, 30x	D-cycloserine	BLA	Cue-induced reinstatement	+	Lee et al., 2009
	Rat	SA (0.5 mg/kg)	Extinction	Cue extinction, Context A, 120x Cue extinction, Context B, 120x	D-cycloserine	Systemic IL, PTL, LA, DH NAc	Cue-induced reinstatement	- + o +	Torregrassa et al., 2010
	Rat	SA (0.15 mg/inj)	Extinction context B	Cue reactivation, Context B, 3x				o	
	Rat	SA (0.15 mg/inj)	Extinction context B	Context reactivation, Context A, 15 min	Rp-cAMPS	BLA pCPU BLA	Context-induced reinstatement	- o	Arguello et al., 2014
	Rat	CPP (12 mg/kg)	Extinction	Cocaine (10 mg/kg, i.p.) reactivation, HC, 2x Cocaine (10 mg/kg, i.p.) + context reactivation, all compartments, 15 min, 2x Cocaine (10 mg/kg, i.p.) + cue (contingents) reactivation, Context A, 15 min, 2x	KN-93 MK-801	Systemic	Cocaine-induced reinstatement	o - o	Brown et al., 2008
	Rat	CPP (10 mg/kg)	None	Context reactivation, all compartments, 15 min	Zif268 ASO	BLA NAc core	Test 2	-	Theberge et al., 2010
	Mouse	CPP (20 mg/kg)	None	Cocaine (20 mg/kg, i.p.) + context reactivation, Drug-paired compartment	SL327	Systemic	Test 2	-	Vaijnt et al., 2006
	Mouse	CPP (20 mg/kg)	None	Context reactivation, all compartments, 20min	MK-801	Systemic	Test 2 Cocaine priming test 2	-	Itzhak, 2008
	Rat	CPP (12 mg/kg)	None	Context reactivation, Drug-paired compartment, 3 min	MK-801 or memantine	Systemic	Test 2 Cocaine priming test 2	-	Alaghand and Marshall, 2013
	Rat	CPP (20 mg/kg)	None	Context reactivation, Drug-paired compartment, 15 min	MK-801	NAc shell	Test 2	-	Li et al., 2016

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Focus	Species	Paradigm	Pre-manipulation	Manipulation	Pharmacological/Behavioral intervention	Site of intervention	Test	Effect	Reference
Receptors (GPCRs)	Rat	SA (0.5 mg/kg)	Extinction	Cue reactivation, Context B, 3x	Propranolol	Systemic	Cue-induced reinstatement	0	Dunbar and Taylor, 2016
	Mouse	CPP (15 mg/kg)	None	Cocaine (1.5 mg/kg, i.p.) reactivation, HC	Propranolol and betaxolol	CeA (and systemic)	Test 2 Cocaine priming test 2	-	Zhu et al., 2018a
				Context reactivation, All compartments, 5 min	ICI 118, 551 Betaxolol		Test 2 re-post-test and cocaine priming re-post-test (after extinction sessions)	0	
	Rat	SA (0.75 mg/kg)		Cocaine (0.75 mg/kg, i.v.) reactivation, HC, 4x	Propranolol and betaxolol	Systemic	SA session Extinction session followed by Cocaine-induced reinstatement	-	
	Rat	CPP (20 mg/kg)	None	Context reactivation, Drug-paired compartment, 15 min	Propranolol SCH 23390 Raclopride	Nac shell	Test 2	0	Li et al., 2016
	Rat	CPP (12 mg/kg)	None	Context reactivation, All compartments, 15 min	Propranolol	Systemic	Test 2	0	Fricks-Gleason and Marshall, 2008
				Context reactivation, All compartments, 15 min, 7x			Cocaine-induced reinstatement	-	
	Rat	CPP (10 mg/kg)	None	Context reactivation, All compartments, 15 min	Propranolol and nadolol	PL-mPFC BLA	Daily tests	0	Otis et al., 2013
	Rat	CPP (10 mg/kg)	None	Context reactivation, All compartments, 15 min	Nadolol	DH	Daily tests Cocaine priming test 2	0	Otis et al., 2014
	Mouse	CPP (20 mg/kg)	None	Context reactivation, Drug-paired compartment, 3 min	PG01037	Systemic	Test 2	-	Yan et al., 2013
	Rat	CPP (10 mg/kg)	None/None	Context reactivation, Drug-paired compartment, 10min Context extinction, All compartments, 5min, 6x	RO5166017	Systemic	Test 2 Cocaine priming test 2 Test 2	0	Liu et al., 2016
	Rat	CPP (10 mg/kg)	Forced abstinence	Context reactivation, Drug-paired compartment, 10min	Cannabidiol	Systemic	Test 2	-	de Carvalho and Takahashi, 2017

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Focus	Species	Paradigm	Pre-manipulation	Manipulation	Pharmacological/Behavioral intervention	Site of intervention	Test	Effect	Reference	
Intracellular signaling	Rat	SA (0.15 mg/inj)	Extinction, Context B	Context reactivation, Context A, 15 min	PP2 PEAOX tetrasodium hydrate	DH	Context-induced reinstatement Context-induced reinstatement	-	Wells et al., 2016	
	Rat	CPP (10 mg/kg)	None	Context reactivation, Drug-paired compartment, 10min Cue (contingents) + context reactivation, Context A, 15 min	Calpain inhibitor mixture	NAc core	Test 2 Cue-induced reinstatement	-	Liang et al., 2017	
	Rat	CPP (10 mg/kg)	None	Context reactivation, Drug-paired compartment, 10min	Sal003	BLA CeA	Test 2	- 0	Jian et al., 2014	
	Rat	CPP (10 mg/kg)	None	Context reactivation, Drug-paired compartment, 10min	β -butyrolactone	BLA CeA	Test 2	- 0	Li et al., 2010	
	Rat	CPP (10 mg/kg)	None	Context reactivation, Drug-paired compartment, 10min	Rapamycin	Systemic	Test 2 Cocaine priming test 2	-	Lin et al., 2014	
	Mouse	CPP (10 mg/kg)	None	Context reactivation, Drug-paired compartment, 10min	SB216763	Systemic	Test 2	-	Shi et al., 2014	
	Rat	CPP (10 mg/kg)	None	Context reactivation, Drug-paired compartment, 10min	NSC23766	NAc core CeA BLA	Test 2	0	Ding et al., 2013	
	Stress-response system	Rat	SA (0.15 mg/inj)	Extinction, Context B	Context reactivation, Context A, 15 min Novel context induce stress (no reactivation), Context C, 15 min	Mifepristone	BLA	Context-induced reinstatement	+	Stringfield et al., 2017
		Mouse	CPP (10 mg/kg)	None	Social defeat stress	None Cycloheximide Propranolol	Systemic	Test 2	+	Hymel et al., 2014
		Mouse	CPP (20 mg/kg)	None	Context reactivation, All compartments, 20min	7-nitroindazole	Systemic	Test 2 Cocaine priming test 2	-	Itzhak, 2008

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Focus	Species	Paradigm	Pre-manipulation	Manipulation	Pharmacological/Behavioral intervention	Site of intervention	Test	Effect	Reference
Epigenetic system	Rat	SA (0.5 mg/kg)	Extinction	Cocaine (0.5 mg/kg, i.v. or 10 mg/kg, i.p.) reactivation, Context B, 2x or HC	Garcinol	Systemic	Cue-induced reinstatement	-	Dunbar and Taylor, 2017
	Rat	SA (1 mg/kg)	Extinction	Cue reactivation, Context B, 3x	Garcinol	Systemic	Cue-induced reinstatement Cocaine-induced reinstatement New conditioned learning	- 0 -	Monsey et al., 2017
	Rat	SA (0.75 mg/kg)	Extinction	Cue (contingents) reactivation, Context A, 15 min	5-AZA	BLA	Cue-induced reinstatement Cue + cocaine - induced reinstatement Cue-induced reinstatement Cue + cocaine-induced reinstatement	-	Shi et al., 2015

Self-administration (SA), conditioned place preference (CPP). Context A corresponds to context of SA, Context B or C to a novel context. Test1 and test2 correspond to CPP post-conditioning measurements. Medial prefrontal cortex (mPFC), prelimbic cortex (PrL), infralimbic (IL), nucleus accumbens (NAc), caudate putamen (CPu, dorsal striatum), basolateral amygdala (BLA), central amygdala (CeA), lateral amygdala (LA), dorsal hippocampus (DH), - decrease, + increase, and 0 no change.

i.e., early-LTP and late-LTP, corresponding to induction and maintenance in which synaptic modifications occur through *de novo* protein synthesis (see review Baltaci et al., 2019). Importantly, a two-phase process is also found in consolidation research (Grecksch and Matthies, 1980).

2.3. Integration and state-dependency

Despite the fact that the consolidation hypothesis is accepted by a large part of the scientific community, some authors have proposed that state-dependency and integration, at least to some degree, could explain the findings of consolidation experiments (Gisquet-Verrier and Riccio, 2018). This alternative hypothesis developed from studies using a passive avoidance paradigm, in which memory impairments induced by cycloheximide were reversed if subjects were presented with a reminder of the original memory (Quartermain et al., 1970). In further work (Gisquet-Verrier et al., 2015), administration of cycloheximide (i.e., protein synthesis inhibitor) following a single session of an inhibitory avoidance task induced amnesia in a later retention test. Importantly, this amnesia was reversed by another cycloheximide injection 30 min prior to the retention test. The same effect was observed with manipulations following memory retrieval, confirming that the original memory was not erased, but still accessible when appropriate cues were provided on the retention test. According to the authors, these effects confirm that an amnesic effect induced by protein synthesis inhibition was induced by a retrieval impairment rather than disruption of memory storage. State-dependency and integration theories consider that the animal's internal state acts as a CS during memory formation. As such, memory recall is inhibited when the internal state of the animal does not match the internal state during memory acquisition. This theory argues that memory is active for a short period of time, during which both internal and external cues will be integrated into this memory in a protein synthesis independent manner (Gisquet-Verrier and Riccio, 2018). Despite the appeal, state dependence and integration theories of memories can not explain all instances of memory consolidation. This includes rare instances of enhanced memory (Lee et al., 2009; Stringfield et al., 2017) and memory impairments when treatments are given beyond the "integration period" (Grecksch and Matthies, 1980; Monsey et al., 2017).

In sum, researchers generally agree on the involvement of an active mechanism underlying memory storage, but this phenomenon is explained by different theories. This review does not address the validity of either proposal, but supports the idea that both phenomena could account for memory formation. The remainder of the review will focus on consolidation and reconsolidation as these are more plausible accounts for memory formation of drug-associated environmental cues.

3. Cocaine and reconsolidation

3.1. Theory of reconsolidation for cocaine addiction

Some psychiatric disorders, such as posttraumatic stress (PTSD) and addiction, are characterized by aberrant and persistent memories. In both cases, strong memories are closely linked to the development of these disorders and to the continuation of associated maladaptive behaviors (Dunbar and Taylor, 2017; Monfils and Holmes, 2018). CS-US associations become abnormally strong and result in chronic anxiety and fear (e.g., PTSD) or in the persistence of drug intake despite negative consequences (e.g., addiction). As with other drugs of abuse, cocaine addiction is characterized by a high vulnerability to relapse, even after prolonged periods of abstinence.

One of the triggers of relapse in humans is exposure to conditioned cues previously associated with cocaine consumption, a phenomenon that can be modeled in rodents using a reinstatement paradigm (Shaham et al., 2003). In this paradigm, animals acquire drug self-administration (SA) or learn to associate a specific location with drug

effects (conditioned place preference, CPP). Responses are then extinguished during a withdrawal period. Reinstatement of the drug-seeking response (lever pressing or time spent in the drug-paired compartment) is traditionally induced by exposure to an acute priming injection of drug, drug-associated cues, or environmental stressors. In the early 2000s, the reinstatement paradigm was incorporated into reconsolidation studies to highlight the relationship between specific memory processes and relapse-like behavior (i.e., reinstatement) (Lee et al., 2006; see review Sorg, 2012). These studies were designed to decipher mechanisms involved in the memory of drug-cue associations. Behavioral protocols of these studies are based on the same sequence of phases as reconsolidation studies using fear conditioning: learning, extinction, reactivation (induced by cues, context, or cocaine) followed by a memory manipulation assay, and reinstatement. Drug reinstatement studies suggested that manipulating reconsolidation of cocaine-associated memories is a potential therapeutic strategy to reduce relapse (Rich and Torregrossa, 2018). The next section will summarize the main findings from this work, highlighting the role of several signaling molecules in mediating reconsolidation of cocaine-associated memories, using CPP and SA paradigms (see Table 1). The main goal of these studies was to reduce cocaine-associated reconsolidation and/or to enhance cocaine-associated extinction.

3.2. Target molecules uncovered in cocaine-associated reconsolidation

A premise of this work is that reconsolidation of cocaine-associated memories follows the same principles as reconsolidation of fear-associated memories, and depends on *de novo* protein synthesis. Indeed, several studies have disrupted cocaine-associated reconsolidation (Fuchs et al., 2009; Wells et al., 2011; Dunbar and Taylor, 2016; Zhu et al., 2018a) using inhibitors of protein synthesis, administered either systemically or *in situ* in the basolateral amygdala (BLA). In contrast, no impact on reconsolidation was observed after dorsal hippocampus (DH) or dorsal striatum (caudate putamen; CPU) inhibition (Ramirez et al., 2009; Fuchs et al., 2009). Further dissociation of protein synthesis effects were revealed with evidence that inhibition of protein synthesis in the medial prefrontal cortex (mPFC) alters reconsolidation of memory triggered by cocaine combined with cocaine-paired cues (Sorg et al., 2015), but not by a context associated with cocaine (Ramirez et al., 2009). This differential outcome suggests that memories triggered by cocaine-associated context versus cocaine combined with discrete cues might be supported by different neural substrates, pathways, and/or mechanisms. Altogether, these results indicate that protein synthesis is a necessary step in cocaine-associated reconsolidation and the effect is mediated in specific brain structures. This site-specific process argues against a general effect of protein synthesis inhibition, as proposed in the state-dependency theory (Gisquet-Verrier and Riccio, 2018).

Studies examining mechanisms of cocaine addiction within a reconsolidation framework have revealed several molecular targets, receptor subtypes, and intracellular pathways that contribute to this process (see Table 1). Given their critical role in learning, memory, and synaptic plasticity (Baudry et al., 2015), it is not surprising that glutamatergic NMDA receptors (NMDARs) are heavily involved in cocaine reconsolidation. Indeed, inhibition of NMDARs, either systemically (Li et al., 2016) or directly in NAc shell (Alaghband and Marshall, 2013) or DH (Wells et al., 2016), affected cocaine-associated reconsolidation. In contrast, NMDARs activation produces inconsistent effects, enhancing both cocaine-associated extinction (Torregrossa et al., 2010) and reconsolidation (Lee et al., 2009), resulting in opposing effects on drug-seeking behavior (i.e., decreases and increases respectively). This could represent a major limitation for therapeutic intervention as it would be difficult to limit effects to an interval that would result in the decrease of cocaine-seeking behavior.

Other molecular targets involved in learning and memory have been investigated in reconsolidation processes, such as calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) and protein kinase A (PKA).

CaMKII inhibition in the BLA weakens cocaine-associated reconsolidation and enhances extinction (Rich et al., 2016), although another study failed to produce the same effect (Arguello et al., 2014). PKA inhibition in the BLA (Sanchez et al., 2010; Arguello et al., 2014), but not in the dorsal striatum (Arguello et al., 2014), disrupts cocaine-associated reconsolidation. Altogether, these results highlight the complexity of molecular mechanisms underlying reconsolidation and extinction of cocaine-associated memories, as both involve learning processes.

Several G protein coupled receptors (GPCRs) have been targeted for modulating reconsolidation in order to reduce cocaine-seeking behaviors. For example, blocking dopaminergic D1 (Li et al., 2016) or D3 (Yan et al., 2013) receptors reduces cocaine-seeking behavior, whereas D2 receptor blockade has no effect (Li et al., 2016). Inhibiting adrenergic receptors produced inconsistent results: no effect (Dunbar and Taylor, 2016) or an inhibition of cocaine-seeking behavior (Fricks-Gleason and Marshall, 2008; Zhu et al., 2018a). These discrepancies could be explained by different ‘reconsolidation’ paradigms, with single or repeated memory manipulations (i.e., one versus multiple retrieval sessions and treatments) producing different effects (Fricks-Gleason and Marshall, 2008). Moreover, reactivation by context versus cocaine also has different effects on the modulation of seeking behavior (Dunbar and Taylor, 2016; Zhu et al., 2018a). This work has been applied to clinical populations of drug addicts with a study examining the efficacy of propranolol, a β -adrenergic antagonist, as a therapeutic strategy targeting reconsolidation (Loneragan et al., 2016). When administered immediately prior to participants reading a personalized script detailing a drug-use experience, the antagonist decreased self-reported drug-craving (Loneragan et al., 2016), suggesting that it interfered with reconsolidation of the drug-associated memory that was reactivated during the script reading. Unfortunately, this study lacked follow-up measures on the percentage of patients who relapsed following study participation. Recently, cannabidiol, a phytocannabinoid agonist, known to have many beneficial effects on several health conditions (Crippa et al., 2018), has been shown to disrupt reconsolidation of cocaine-associated context memory in rats (de Carvalho and Takahashi, 2017). These pharmacological agents could represent promising candidates for treating relapse to cocaine use.

In addition to GPCRs, a number of intracellular signaling mechanisms have been investigated in reconsolidation processes related to cocaine administration in rodents. Systemic or *in situ* (e.g., NAc or amygdala) disruption of specific pathways, including mTOR, Cdk5, eIF2 α , decreases cocaine-associated reconsolidation, leading to a reduction of cocaine-seeking behavior. Some studies have examined the effect of stress on relapse-like behavior and/or cocaine-associated memories but whether this directly impacts reconsolidation is still not fully understood (see Table 1). Interestingly, cellular stress-like NOS signalling pathways disrupt reconsolidation and reduce cocaine-seeking behavior (Itzhak, 2008). Cocaine induces transcriptional adaptations in brain structures (Piechota et al., 2010) and some of these modifications are under the control of epigenetic factors (De Sa Nogueira et al., 2019), which themselves are involved in cocaine-associated reconsolidation. For example, intra-amygdala inhibition of DNA-methyltransferase (Shi et al., 2015) or systemic inhibition of histone acetyltransferase (HAT) (Monsey et al., 2017; Dunbar and Taylor, 2017) disrupt reconsolidation of cocaine memories.

In conclusion, the process of reconsolidation in cocaine addiction has been demonstrated, although limitations for therapeutic interventions remain. The wide diversity of experimental paradigms, the brain areas under study, and the specificity of the pharmacological tools may explain the diverse findings on reconsolidation related to cocaine-seeking behavior. Notably, the reactivation phase appears to be critical in this process, as reduction of seeking behavior may result from an action on either extinction or reconsolidation. Furthermore, cues, context, or cocaine reactivation involve distinct memory pathways that may be differentially altered by candidate molecules. Therapeutic approaches, even if promising, require further investigation to selectively target the reconsolidation process in cocaine addiction.

4. Neuroinflammation and memory

It is interesting to note that some of the pharmacological agents tested in the framework of the reconsolidation theory of cocaine addiction display anti-inflammatory properties. The resulting effects on cocaine seeking behavior, therefore, could also be explained, at least partially, by an inhibition of neuroinflammation. For example, garcinol (Monsey et al., 2017; Dunbar and Taylor, 2017) is considered a HAT inhibitor, and cannabidiol (de Carvalho and Takahashi, 2017) is a “multi-target” compound which affects several channels and/or receptors, including the cannabinoid 2 receptor (CB2R) (Devinsky et al., 2014). Noticeably, both pharmacological tools also display anti-inflammatory (e.g., direct and indirect inhibitor of NF κ B activation) and antioxidant (e.g., inhibition of iNOS) properties (see reviews Padhye et al., 2009 and Kozela et al., 2017). Moreover, among the molecular targets highlighted in reconsolidation of cocaine memories, some are also involved in inflammatory mechanism. For example, the β -adrenergic receptor pathway, which is currently targeted in human trials, displays cross-talk with immune and inflammatory pathways (see review, Scanzano and Cosentino, 2015). The β -adrenergic receptors are considered to be immunomodulators. Opposite results have been described following stimulation of β -adrenergic receptors, with either an anti-inflammatory action or an enhancement of a pro-inflammatory state (see review, Kolmus et al., 2015). In addition, other downstream signaling molecules, also studied in cocaine-associated reconsolidation, have been linked to inflammatory pathways, such as PKA (Tao et al., 2016; Ghosh et al., 2016) and CaMKII (Tsakiri et al., 2008). The former appears to be necessary for microglial transition from pro-inflammatory to anti-inflammatory states, whereas CaMKII mediates interleukine synthesis in neuronal cultures challenged for immune responses. Based on these observations, neuroinflammatory processes during cocaine reconsolidation represent an important line of further investigation.

4.1. Neuroinflammation: general process

For many years, the brain was thought to be an “immune-privileged” organ, protected by the blood brain barrier that isolates the central nervous system (CNS) from the peripheral immune system. Lately, a significant body of evidence has revealed the existence of a specific innate immune system inside the CNS which, when activated, results in neuroinflammation (see review Rivest, 2009). Microglia plays an important role in this process as they are CNS resident macrophage-derived cells and have a major role in immune surveillance (Subramaniam and Federoff, 2017). Besides microglia, all brain cell types (e.g., astrocytes, oligodendrocytes, and neurons) are also involved in the neuroinflammatory process.

The main pathway involved in neuroinflammatory processes is triggered by pattern recognition receptors (PRR), including pathogen- or danger-associated patterns (i.e., PAMPs and DAMPs), which address pathogen invasion or tissue damage. The most common PRR, the Toll-like receptors (TLRs), are primarily expressed on microglia, although variable combinations of TLRs are also expressed by astrocytes, neurons, and other non-neuronal cells (i.e., endothelial and oligodendrocytes) (Hanamsagar et al., 2012). There are approximately a dozen TLR family members in mammals, which respond to specific stimuli. Activation of all TLRs (with the exception of TLR3) induces MyD88 activation, leading to the induction of nuclear factor κ B (NF κ B) and pro-inflammatory cytokine release (i.e., IL-1 β , IL-6 or TNF α) (Brown et al., 2011). In contrast, TLR3 induces a TRIF-dependent pathway leading to IRF3 activation and secretion of other cytokines, such as IFN γ , although this signaling pathway can also be triggered by TLR4 through an adaptor protein, TRAM. Both MyD88 and TRIF-dependent pathways also stimulate mitogen-associated protein kinase (MAPK) including ERK, p38, and JNK (Brown et al., 2011). These neuroinflammatory pathways exert a critical influence on memory processes. The two following sections summarize the literature on this topic,

focusing on pro-inflammatory cytokines expressed by both glia and neurons (i.e., IL-1, IL-6 and TNF α) (for a more detailed review, see Yirmiya and Goshen, 2011).

4.2. Detrimental effects of neuroinflammation on memory

The majority of literature on neuroinflammation and memory supports the idea that neuroinflammation has detrimental effects on memory, which have been demonstrated, primarily, by observations in neurodegenerative diseases (Bader and Winklhofer, 2019). More specifically, neuroinflammation has been associated with memory impairment in various animal paradigms that match consolidation. For example, exogenous IL-1 β induces alterations in biological processes that support LTP, thereby preventing the emergence of LTP (Katsuki et al., 1990). Moreover, exogenous IL-1 β or bacterial infection that increases IL-1 β , do not affect acquisition of spatial learning in the Morris water maze, but reduce performance in the retention phase (Oitzl et al., 1993; Gibertini et al., 1995). In the same way, lipopolysaccharide (LPS) injections (Pugh et al., 1998), or IL-1 β intracerebroventricular or intrahippocampal administration (Barrientos et al., 2002) induce impairments in contextual fear conditioning. Moreover, this effect is reversed by IL-1ra (i.e., natural antagonist of IL-1 receptor) injections (Pugh et al., 1998). Importantly, animals pre-exposed to the context before conditioning showed no deficit suggesting that the impairment resulted from an alteration of the context-associated consolidation processes, but not from the association between the context and the aversive stimulus (Pugh et al., 1998; Barrientos et al., 2002). Finally, chronic neuroinflammation in transgenic mice overexpressing IL-1 β has been revealed through up-regulation of inflammatory mRNAs molecules in the hippocampus (Moore et al., 2009; Hein et al., 2010). These mice show impairments in contextual, but not auditory, fear conditioning (Hein et al., 2010), as well as deficits in spatial learning in the water maze, which were negatively correlated with gene regulation (Moore et al., 2009).

Chronic neuroinflammation, induced by repeated LPS infusions, has been linked to increases in TNF α , TNFR2, and IL-1 β hippocampal expression (Belarbi et al., 2012). Impairments of both acquisition and consolidation in a spatial water maze, following chronic LPS, were rescued by DT 3,6'dithiothalidomide, a blocker of TNF α activity (Belarbi et al., 2012; Russo et al., 2012). Together, these results indicate that elevated level of IL-1 β and TNF α , inducing neuroinflammatory processes, have a detrimental effect on contextual memory. Noticeably, high doses of pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 β , IL-6, or TNF α , or administration of pathogens, can induce a state of “sickness behavior” (Lacosta et al., 1999). Mice injected with IL-1 β display spatial deficit only in a warm-water maze (i.e., 23 °C) and not in cold-water maze (i.e., 18 °C) from which they may have a stronger motivation to escape (Gibertini, 1998) (for a review, see Cunningham and Sanderson, 2008). This state of sickness could partly account for altered memory through state-dependency processes or change in motivation.

4.3. Beneficial effects of neuroinflammatory markers on memory

Studies examining the role of pro-inflammatory markers in memory suggest that a balance of several cytokines is necessary for the establishment and maintenance of a memory trace. Tetanic bursts that induce LTP, *ex vivo* or *in vivo*, lead to hippocampal up-regulation of mRNA for a number of cytokines, such as IL-1 β , IL-6 and IL-1ra, although TNF α expression is not altered (Schneider et al., 1998; Balschun et al., 2004; del Rey et al., 2013); these effects were observed only in rats displaying persistent LTP for more than 3 h. Importantly, prior administration of AP-5 (i.e., an NMDAR antagonist) prevented this up-regulation. These data suggest that cytokines are involved in LTP mechanisms at a time point that matches a consolidation phase. The IL-1 β cytokine plays a critical role in these processes, as no LTP could be measured in mice deficient for the IL-1 receptor (IL-1RrKO) (Avital

et al., 2003). Pharmacological intervention showed that inhibition of IL-1 β , via administration of the IL-1ra antagonist 90 min after tetanic bursts, reduced population spikes to pre-LTP values (Schneider et al., 1998). This effect was not observed when the antagonist was administered 30 min prior to, or 5 min after, LTP induction, indicating that IL-1 β is necessary for LTP maintenance, but not induction. An opposite effect was observed with an antibody that blocks IL-6, resulting in sustained maintenance of LTP for a longer time and increased spatial memory (Balschun et al., 2004). In sum, both cytokines display time-dependent effects on memory, with IL-1 β being implicated in LTP maintenance and IL-6 in LTP duration. This dual action of IL-1 and IL-6, at a time point corresponding to consolidation, reveals a complex mechanism of cytokine activation in the healthy brain. The establishment of a balance may result in a more coherent memory trace. Behavioral experiments also support this idea. Mice deficient for the IL-1 receptor (Avital et al., 2003) or overexpressing an IL-1 receptor natural antagonist (IL-1raTG) (Goshen et al., 2007) display impairments in spatial learning and contextual fear conditioning, but show no difference in non-spatial learning (i.e., visible platform in water maze) or auditory fear conditioning. Up-regulation of transcripts for IL-1 β and IL-6, but not IL-1ra or TNF α , are observed in the hippocampus, 2 h following spatial learning (e.g., Y-maze) (del Rey et al., 2013) and 24 h following fear conditioning (Goshen et al., 2007). The latter effect was observed in WT, but not in IL-1rKO and IL-1raTG, mice. Taken together, these results indicate a role for IL-1 β and IL-6 in contextual memory (i.e., consolidation).

The neuroinflammatory marker, TNF α , has been implicated in cognitive-associated diseases such as Alzheimer's disease (Decourt et al., 2017), but its role in memory processes is more controversial. Neuronal cell cultures exposed to TNF α displayed an increased number of AMPAR at the membrane, arguing for the involvement of TNF α in AMPAR trafficking and therefore in synaptic strength modulation (Beattie et al., 2002). Also, mice deficient for TNFR show decreased LTP and LTD in hippocampal slices (Albensi and Mattson, 2000). In contrast, no TNF α transcript modification was observed in the hippocampus following either LTP-induction or learning (del Rey et al., 2013), suggesting that further research is required to unravel the specific role of TNF α in memory.

The signaling pathway for NF κ B, a transcription factor initially described in the immune system but actually expressed in brain parenchyma, plays a central role in immune and inflammatory responses. NF κ B can be activated by several pro-inflammatory cytokine signaling pathways (Bonizzi and Karin, 2004) and by LTP-inducing protocols (Freudenthal et al., 2004). Indeed, NF κ B regulates LTP-induced plasticity (Albensi and Mattson, 2000) and, among genes regulated by NF κ B, some are coding proteins located at the synapses, such as PSD95, NCAM or AMPA receptor subunits (Engelmann and Haenold, 2016). These findings suggest that NF κ B is involved in long-term memory, a proposal that has been verified in behavioral experiments. For example, NF κ B is rapidly activated in the hippocampus by contextual emotional memory (Freudenthal et al., 2005) and in the amygdala by conditioned fear (Yeh et al., 2002). In addition, altering NF κ B activation or disrupting NF κ B activity during consolidation/reconsolidation produce memory impairments during a retention test (Freudenthal et al., 2005; de la Fuente et al., 2011, 2014). Moreover, NF κ B is inhibited following cue-extinction, suggesting a complex role for this transcription factor (de la Fuente et al., 2011). Collectively, these results indicate that extracellular signals, initially related to inflammation, could in fact play a role in physiological processes of memory consolidation and reconsolidation.

In conclusion, both detrimental and beneficial effects of cytokines on memory processes have been described, and this differential consequence is dependent on the dose of cytokines, specifically physiological (low) versus pathological (high) states (see above). In line with this idea, some studies emphasize an inverted U-shape dose-effect of IL-1 on memory (Brennan et al., 2003; Goshen et al., 2007). Indeed, high doses of IL-1 β impair contextual fear conditioning in mice, whereas low

doses enhance it (Goshen et al., 2007), confirming that neuroinflammation plays a role in spatial and contextual memories. Hippocampus-dependent memory is clearly modified by neuroinflammation markers, but no convincing data exist on whether other types of memories, such as cue-associated or emotional memory, are also modulated. Further exploration will bring insight into the neuroinflammatory mechanisms involved in different kind of memories. Also, as all the data on cytokines summarized here were obtained following learning (i.e., consolidation), it is critical to explore the role of these cytokines in memory retrieval. This would uncover a potential role of these cytokines in reconsolidation.

5. Cocaine and neuroinflammation

Drugs of abuse, and in particular alcohol, trigger neuroinflammation, although less is known about the effects of cocaine on neuroinflammation (see reviews Clark et al., 2013; Lacagnina et al., 2017). Table 2 summarizes these few studies, highlighting the regulation of neuroinflammatory markers, both *in vitro* (cell culture) and *in vivo* (rodent, primate and human). In humans, chronic cocaine use is associated with increased serum levels of the pro-inflammatory cytokine, IL-6, and decreased serum levels of the anti-inflammatory cytokine, IL-10 (Moreira et al., 2016), pointing to a global pro-inflammatory effect. This idea is supported by evidence of enhanced microglia activation in post-mortem brains of cocaine users (Little et al., 2009). In contrast, no difference in microglia activation in grey matter was observed in living cocaine users, using a positron emission tomography (PET) imaging technique (Narendran et al., 2014). Patients in the PET study were abstinent for a minimum of 14 days, whereas individuals in the post-mortem study had used cocaine at least once in the 2 weeks prior to death. Neuroinflammation induced by cocaine, therefore, may not persist beyond a 2-week interval. The discrepancy could also reflect differences in the brain region investigated (grey versus white matter). Indeed, microglia activation in living nonhuman primates increased, specifically in white matter, following cocaine use (Smith et al., 2019).

Further work has examined potential mechanisms involved in pro-inflammatory consequences of cocaine use. The cocaine-induced “xenobiotic hypothesis” proposes that cocaine is recognized by the immune system as a foreign xenobiotic component (see review Hutchinson and Watkins, 2014). Indeed, cocaine binds directly to the MD2 domain of TLR4 in the VTA (Northcutt et al., 2015), a PRR known to be triggered by xenobiotic components (Hutchinson and Watkins, 2014). The interaction with TLR4 further increases DA release in the NAc (Northcutt et al., 2015), which suggests a synergetic effect with the direct action of cocaine on monoamine-reuptake transporters. Furthermore, several downstream elements of a TLR4 pathway are up-regulated by cocaine, both *in vitro* and *in vivo* (see Table 2), including NF κ B, IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF α , MAPK, IRAK1, MyD88, and TRAF6. In addition, downregulation of IL-10 has been reported following cocaine intake (Ang et al., 2001; Russo et al., 2009; Lin et al., 2011; Moreira et al., 2016; Liao et al., 2016; Brown et al., 2018; Zhu et al., 2018b; Periyasamy et al., 2018), again supporting a global proinflammatory process. Cocaine also indirectly enhances pro-inflammatory markers through other TLRs, including TLR2 and TLR3 (Liao et al., 2016; Zhu et al., 2018b), that could participate in the downstream regulations observed. In sum, targeted approaches have revealed the importance of TLRs pathways in inflammatory processes following cocaine exposure.

Interestingly, genome-wide approaches have also pointed to regulation of a wide variety of inflammatory molecules following cocaine intake. For example, analysis of genomic data (Clark et al., 2013) obtained from whole RNA sequencing studies (Ahmed et al., 2005; Renthal et al., 2007 and Piechota et al., 2010) highlight gene expression increases in inflammatory modulators in several brain reward structures (e.g., dorsal striatum, NAc, PFC, amygdala, septum, lateral hypothalamus, and VTA), following acute or chronic cocaine intake in rats. A global increase in neuroinflammatory marker expression was confirmed in an RNAseq study of both NAc and VTA

Table 2
Summary of research findings on cocaine-induced neuroinflammation.

Species	Cocaine exposure/protocol	Localisation	mRNA/protein	Inflammation marker/modulators	Effect	Reference
Human	Cocaine users	Serum levels	protein	IL-6	+	Moreira et al., 2016
Human	Cocaine users, Post-mortem	Striatum, hippocampus, and entorhinal cortex	protein	IL-10	-	Little et al., 2009
Human	Cocaine users	dIPFC, OFC, mPFC, ACC, striatum, sensorimotor cortex, amygdala and hippocampus	protein	CD68, RCA-1 (activated microglia)	+	Narendran et al., 2014
Primate	SA (0.3 mg/kg, i.v., 15months)	Striatum	protein	18kDa translocator protein (activated microglia)	+	Smith et al., 2019
Rat	10 mg/kg i.p., 1x	vmPFC, NAc, VTA	mRNA	IL-1β	+	Northcutt et al., 2015
Rat	SA (0.5 µg/kg, i.v., 15days)	VTA	mRNA	IL-1β, GFAP, IκBα, CD11b	+	Brown et al., 2018
Rat	SA (0.5 mg/kg, i.v., 6 h, 10days) + traumatic brain injury	PFC, OFC, NAc, Striatum	protein	TNFα	o	Vonder Haar et al., 2019
Mouse	20 mg/kg i.p., 14x	NAc	mRNA	IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL12, TNFα, IFNγ	+	Ang et al., 2001
Mouse	20 mg/kg i.p., 5x	Striatum	protein	NFκBp65, NFκBp105, IκBp70	+	Russo et al., 2009
Mouse	CPP (20 mg/kg, i.p., 3x)	mPFC, NAc	protein	NFκBp65, NFκBp105, IκBα, IκBβ	o	Lin et al., 2011
Mouse	15 mg/kg i.p., 5x	NAc core	mRNA and protein	TNFα	-	Lewitus et al., 2016
Mouse	CPP (20 mg/kg, i.p., 3x)	NAc	protein	IL-1β	o	Zhu et al., 2018b
Cell (HBMECs) - Mouse	10 µM - 20 mg/kg i.p., 7x	Microvessels	mRNA and protein	GFAP	+	Yao et al., 2011
Cell - Mouse	10 and 100 mM for 24 to 48 h -20 mg/kg i.p., 7x	Microglia	protein	p-NFκBp65, IKKβ, p-IκBα	+	Guo et al., 2016
Cell (BV-2) - Mouse	10 µM for 1 h - 20 mg/kg i.p., 7x	Microglia	mRNA and protein	PDGF	+	Liao et al., 2016
Cell (BV2 and microglial) - Mouse	10 µM for 24 h - 20 mg/kg i.p., 7x	Striatum	mRNA and protein	miR124	-	Pertiyasamy et al., 2018
Cell (pericytes) - Mouse	10 µM for 24 h - 20 mg/kg i.p., 7x + miR124 overexpressing	Brain capillaries	mRNA	DNMT1 3a	+	
	10µM for 1–10 h - 20 mg/kg i.p., 7x			TLR2 - TNFα - IL6 - MCP1 - Iba1	+	
				miR124	-	
				TLR4, IRAK1, TRAF6, MyD88, KLF4, TNFα, IL6, IL1β, NOS2 CCL2	+	
				TGFβ, IL4, IL10	+	
				CXCL10, VEGF, CCL2	+	Niu et al., 2019

Self-administration (SA), conditioned place preference (CPP), prefrontal cortex (PFC), orbitofrontal cortex (OFC), anterior cingulate cortex (ACC), nucleus accumbens (NAc) _ + increase, - decrease, o no change.

samples from cocaine self-administering nonhuman primates (Vallender et al., 2017). Pro-inflammatory cytokines, cytokine receptors, chemokines, TLRs, MMPs, ADAMs, PDGFs, and MCSF are among the genes up-regulated by cocaine. These data highlight novel candidates involved in cocaine-induced adaptations, in addition to those identified in targeted approaches.

Overall, cocaine intake is consistently associated with increases in a number of neuroinflammatory markers. Several drugs of abuse cause activation of microglia and astrocytes through signaling of neuroinflammatory markers, which influence neuronal function (Lacagnina et al., 2017). Blocking this brain reaction to cocaine by anti-inflammatory strategies, both in rodents and humans, has shown efficacy in alcohol abuse treatment by acting on drug intake, craving, or relapse (see reviews Ray et al., 2014; Kohno et al., 2019). Few studies have examined the effect of anti-inflammatory agents in cocaine addiction, although these have produced intriguing results. For example, administration of (+)naloxone, a specific TLR4 antagonist, prevents the development of cocaine place preference in rats (Northcutt et al., 2015). N-acetylcysteine is an antioxidant and anti-inflammatory agent which has been examined for treating several psychiatric and neurological disorders associated with dysfunction in oxidative stress, neuroinflammation, as well as, glutamate and dopamine dysregulation (see review Deepmala et al., 2015). Interestingly, N-acetylcysteine displays promising anti-relapse effects both in pre-clinical and clinical studies (for a review, see Nocito Echevarria et al., 2017). Indeed, in clinical studies, N-acetylcysteine decreases desire and interest toward cocaine when given after a cue-reactivity procedure (i.e., slides depicting cocaine and cocaine-use) (LaRowe et al., 2007). The drug also increases time to relapse and reduces craving in abstinent addicts, whereas it had no effect on craving or drug intake in cocaine consumers at the time of the experiment (LaRowe et al., 2013). These results are supported by pre-clinical studies in rodents. In a long-access paradigm inducing escalation, N-acetylcysteine prevents increased cocaine intake and blocks cocaine-induced locomotor sensitization as well as cocaine-induced reinstatement (Madayag et al., 2007). In contrast, it had no effect on cocaine intake *per se* in humans (Madayag et al., 2007). Altogether, N-acetylcysteine represents a good candidate for intervention in cocaine abstinent patients. Further investigation exploring other inflammatory markers induced by cocaine could provide informative data for developing novel strategies to reduce cocaine-relapse.

6. Conclusions

The idea that addiction may reflect maladaptive memory has emerged, with an emphasis on developing therapeutic strategies to counter recurrent relapse in cocaine addiction. Numerous animal studies confirm that disruption of cocaine-associated memories (i.e., reconsolidation) decreases cocaine-seeking behavior. Based on this evidence, a combination of behavioral and pharmacological treatments should be further investigated in human clinical trials. Uncovering the underlying mechanisms of cocaine-associated memories will help to target pathways and time points of effective therapeutic strategies. Indeed, some of the results summarized above suggest that mechanisms other than reconsolidation (e.g., disruption in extinction or impairment in retrieval) may contribute to this process. Therefore, the retrieval protocol and the time window within which pharmacological or behavioral interventions occur are essential elements in the ensuing alterations of cocaine-seeking behavior.

Among potential lines of investigation, neuroinflammation is an intriguing possibility. Indeed, many neuroinflammatory markers, such as pro-inflammatory cytokines or their upstream regulator NF κ B, are up-regulated by cocaine intake. Development of a pro-inflammatory state has been confirmed by targeted and whole-genome approaches. Such cytokines are crucial players in memory processes, with the specific impact depending on the intensity and duration of the inflammatory process. Further work is required in this area, but it is now clear that interactions between memory processes and neuroinflammation following cocaine use could represent

new targets for therapeutic interventions to reduce relapse. Among molecules involved in both neuroinflammation and memory, factors like NF κ B represent an appealing target. We have previously shown that rats that self-administer cocaine display differential epigenetic regulation of genes organized around this transcription factor (Fonteneau et al., 2017). Moreover, genome-wide association studies in cocaine users, focusing on genes related to learning, memory, and synaptic plasticity, have highlighted two single nucleotide polymorphisms on *nfkbl*, encoding for NF κ Bp105/p50 (Levan et al., 2015). In addition, investigations of reconsolidation processes have revealed that inhibition of NF κ B can disrupt fear-associated reconsolidation (de la Fuente et al., 2011) or morphine-CPP associated reconsolidation (Yang et al., 2011). Hence, acting on the NF κ B pathway may be an appropriate approach to disrupt cocaine-associated reconsolidation and, therefore, decrease relapse.

Among the strategies proposed to directly impact reconsolidation of cocaine memories, the β -adrenergic blocker, propranolol, is under investigation at the clinical level and displays promising effects. Another target for cocaine-associated memory could be N-acetylcysteine. Indeed, the anti-reinstatement effect of this compound could also be explained by the restoration of neuroplasticity at cortico-striatal synapses induced through its action on the cysteine-glutamate exchanger (Madayag et al., 2007; Moussawi et al., 2009). This inability to use neuroplasticity could explain, at least partially, the difficulties of addict individuals to learn new behaviors to reduce cocaine intake. Moreover, as N-acetylcysteine decreases craving in humans when given after cue-retrieval (LaRowe et al., 2007), it could provide beneficial effects on cocaine-associated reconsolidation. Remarkably, both propranolol and N-acetylcysteine also have anti-inflammatory properties that could account for their ability to reduce relapse. As with many mental health disorders, pharmacological treatments for cocaine abuse are often more effective when combined with behavior modification programs. Of these, cognitive behavioral therapy (CBT), is one of the most effective, particularly in terms of increasing treatment retention and reducing relapse (Penberthy et al., 2010). Although it has yet to be tested, principles of reconsolidation could be incorporated into CBT treatment by raising patient awareness of cue-drug associations and how these are modified with repeated memory reactivation. Altogether, it appears that developing a strategy combining anti-inflammatory agents, cocaine-associated memory manipulations, and CBT could hold promising treatment for altering cocaine-seeking behavior.

Acknowledgements

This work was supported by Université de Strasbourg, Investissements d'Avenir Idex, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Projet International de Coopération Scientifique (PICS), and Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

References

- Ahmed, S.H., Lutjens, R., van der Stap, L.D., Lekic, D., Romano-Spica, V., Morales, M., Koob, G.F., Repunte-Canonigo, V., Sanna, P.P., 2005. Gene expression evidence for remodeling of lateral hypothalamic circuitry in cocaine addiction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 11533–11538. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504438102>.
- Alagband, Y., Marshall, J.F., 2013. Common influences of non-competitive NMDA receptor antagonists on the consolidation and reconsolidation of cocaine-cue memory. *Psychopharmacology (Berl.)* 226, 707–719. <https://doi.org/10.1007/s00213-012-2793-y>.
- Albensi, B.C., Mattson, M.P., 2000. Evidence for the involvement of TNF and NF κ B in hippocampal synaptic plasticity. *Synapse* 35, 151–159.
- Ang, E., Chen, J., Zagouras, P., Magna, H., Holland, J., Schaeffer, E., Nestler, E.J., 2001. Induction of nuclear factor-kappaB in nucleus accumbens by chronic cocaine administration. *J. Neurochem.* 79, 221–224.
- Arguello, A.A., Hodges, M.A., Wells, A.M., Lara, H., Xie, X., Fuchs, R.A., 2014. Involvement of amygdalar protein kinase A, but not calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, in the reconsolidation of cocaine-related contextual memories in rats. *Psychopharmacology (Berl.)* 231, 55–65. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3203-9>.
- Avital, A., Goshen, I., Kamsler, A., Segal, M., Iverfeldt, K., Richter-Levin, G., Yirmiya, R., 2003. Impaired interleukin-1 signaling is associated with deficits in hippocampal

Objectifs du travail de thèse

Dans ce contexte scientifique, l'objectif de mon travail était d'étudier l'implication des voies habituellement mises en jeu dans les processus inflammatoires dans la consommation de cocaïne et les comportements associés. Au vu des données de la littérature, nous avons décidé de focaliser notre travail sur la voie de signalisation du facteur de transcription NFκB. En effet, notre équipe a récemment montré l'implication de cette voie de signalisation dans une étude s'intéressant aux modifications épigénétiques induites par la cocaïne dans le cortex préfrontal (Fonteneau et al., 2017). J'ai abordé mon travail selon deux axes de recherche principaux pour proposer des éléments de réponse aux deux questions suivantes :

Question 1 : La voie du NFκB est-elle impliquée dans la consommation de cocaïne ?

Malgré de très nombreuses données dans la littérature indiquant la stimulation de l'inflammation dans la consommation de plusieurs substances addictives telles que l'alcool ou les méthamphétamines (Lacagnina et al., 2017), les arguments en faveur d'une telle adaptation dans le cerveau à la suite de la consommation de cocaïne sont plus discutées. Plusieurs études réalisées à la fois chez l'homme, le primate non-humain et le rongeur laissent supposer une implication de ces mécanismes neuroinflammatoires dans la consommation de cocaïne (Table 2 in Correia et al., 2020). Nous avons souhaité explorer l'hypothèse de l'implication de la voie du NFκB dans la consommation de cocaïne pour mieux comprendre les mécanismes d'adaptations mis en place à la suite de la consommation de drogue. Aussi, les résultats chez l'homme sont peu nombreux, et toujours controversés. En effet, certaines études démontrent une augmentation de l'activation microgliale *post mortem* et du rapport cytokines pro-inflammatoires/anti-inflammatoires sériques chez des consommateurs (Little et al., 2009; Moreira et al., 2016) alors qu'aucune modification de l'activation microgliale n'a pu être montrée en imagerie IRM chez des patients (Narendran et al., 2014). D'autre part, la plupart des études menées chez le rongeur se basent sur une mise en présence non-volontaire de la cocaïne (injections réalisées par l'expérimentateur) ou une prise volontaire mais dans un temps relativement court (<15jours) (Brown et al., 2018).

Dans cet axe, nous avons donc utilisé un protocole plus proche de la situation pathologique, où les rats consomment de la cocaïne de façon volontaire (protocole d'auto-administration) et chronique, sur le long terme (>1mois). Dans ces conditions nous avons mesuré l'activation du facteur NFκB au niveau de plusieurs structures cérébrales impliquées dans le système de la récompense. Ces expériences permettront de compléter les données de la littérature indiquant que des injections passives

sur une courte durée induisent l'augmentation du facteur de transcription NFκB au niveau du NAc. Enfin, à notre connaissance, aucune étude à l'heure actuelle n'a exploré si une augmentation de l'activation de NFκB à la suite de la consommation de cocaïne pouvait avoir une fonction physiologique sur le comportement lui-même. Pour préciser ce point nous avons proposé une approche pharmacologique avec des inhibiteurs de la voie du NFκB et évalué leurs effets sur la consommation de cocaïne et la motivation pour obtenir la drogue.

Question 2 : La voie du NFκB a-t-elle une fonction dans la mémoire-associée à la cocaïne ?

La dépendance à la cocaïne est principalement caractérisée par des rechutes récurrentes qui surviennent même après une longue période d'abstinence et perpétuent ainsi la pathologie. Parmi les mécanismes proposés dans ces phénomènes de rechute, les mécanismes de mémoire et d'apprentissage sont particulièrement privilégiés. En effet, la dépendance à la cocaïne est reconnue depuis longtemps pour être une pathologie liée à une mémoire et un apprentissage inadaptes (Everitt, 2014). Notamment, une association entre les effets renforçateurs de la cocaïne et les indices environnementaux est mise en place rapidement au cours du développement de la pathologie. Ainsi, la présentation des indices environnementaux précédemment associés à la cocaïne peuvent à eux seuls provoquer une envie irrésistible de la consommer et induire une rechute après une période d'abstinence prolongée (Volkow et al., 2016). Récemment, le concept de consolidation et reconsolidation de la mémoire a été suggéré comme ayant un rôle important dans le développement de la dépendance (Dunbar and Taylor, 2017; Monfils and Holmes, 2018) et notamment dans la mise en place de cette association renforcée entre les indices et les effets de la cocaïne. Ainsi, de nombreuses études ont depuis le début du 21^{ème} siècle permis d'identifier des facteurs moléculaires et cellulaires impliqués dans la reconsolidation des souvenirs associés à la prise de cocaïne. Ces molécules représentent des cibles pour fragiliser l'association (indice/droge) et ainsi réduire le risque de rechute (Table 1 in Correia et al., 2020). Notre analyse des agents pharmacologiques étudiés dans cette problématique a révélé comme une évidence l'intérêt de cibler les facteurs neuroinflammatoires, notamment le NFκB. En effet, ce facteur a déjà été démontré comme étant indispensable à la reconsolidation des souvenirs associés à un choc électrique (i.e., conditionnement de peur) (de la Fuente et al., 2011), ainsi que ceux associés aux effets renforçateurs de la morphine (i.e., en conditionnement de place) (Yang et al., 2011). De plus, ce facteur présente une fonction physiologique au niveau synaptique notamment dans les processus de plasticité synaptique, d'apprentissage et de mémoire (Albensi and Mattson, 2000; Engelmann and Haenold, 2016; Freudenthal et al., 2005).

Ainsi dans le second axe de recherche de mon travail, j'ai mis au point un protocole de reconsolidation permettant d'étudier les processus mis en jeu dans l'association mnésique entre les indices environnementaux et les effets renforçant de la cocaïne. Nous avons alors utilisé deux inhibiteurs de l'activation du NF κ B et mesuré les effets de leur administration pendant la phase de reconsolidation sur le risque de rechute. Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans cette période de reconsolidation, nous avons analysé l'expression de gènes cibles du NF κ B et quantifié la forme activée de ce facteur au niveau protéique, durant cette même période.

Matériels et méthodes

1 Généralités

1.1 Les animaux

Toutes les expériences sont réalisées avec des rats Wistar mâles (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) pesant 150-175 g à leur arrivée. Tous les animaux sont stabulés à 2-6/cage, excepté durant les 5-8 jours de récupération post-opératoire où ils sont isolés, et ont accès à de la nourriture et de l'eau *ad libitum*. Dès leur arrivée, les animaux sont placés en cycle jour/nuit inversé de 12 h/12 h (lumières allumées à 8h00 et éteintes à 20h00). Les paramètres de température ($23^{\circ}\text{C} \pm 2$) et d'humidité ($35\% \pm 5$) de la salle de stabulation sont quotidiennement contrôlés. Les deux premières semaines sont consacrées à l'habituation des animaux à leur nouvel environnement et à la manipulation par l'expérimentateur. Les rats sont pesés tous les 3 jours tout le long des expériences comportementales.

Toutes les expériences ont été réalisées en accord avec la réglementation française et européenne concernant le bien-être animal (Directive européenne 2010/60/EU – Loi française du code rural R 214-87 à 131) et ont été validées par un comité d'éthique (Comité Régional d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animale de Strasbourg, CREMEAS). Au total 486 rats ont été utilisés au long de la thèse sous les numéros d'autorisation de projets APAFIS #168, #7052 et #17797 selon les expériences.

1.2 Les substances injectées

1.2.1 *La cocaïne*

Le chlorhydrate de cocaïne (Cooper) est dilué dans du NaCl 0,9% stérile avant injection. Selon les paradigmes expérimentaux, la cocaïne est injectée par voie intraveineuse (i.v.) ou intrapéritonéale (i.p.). Les concentrations de cocaïne sont, individuellement, ajustées en fonction du poids de l'animal.

1.2.2 Le solvant

Le diméthylsulfoxyde (DMSO) est un solvant organique qui nous permet de dissoudre les agents pharmacologiques utilisés. Il est dilué et injecté en i.p. à un volume de 200 µL/100g de poids corporel. Les animaux « véhicules » et « traités » reçoivent tous une injection de DMSO à 1,5%.

1.2.3 Les agents pharmacologiques

Le parthénolide (PTD, Santa Cruz) est un inhibiteur des IKK et empêche l'activation de la voie du NFκB (Dey et al., 2016; Kwok et al., 2001). Le PTD est utilisé à 0,3, 1 et 3 mg/kg, i.p. (Rummel et al., 2011; Sheehan et al., 2002).

L'andrographolide (AGL, Sigma Aldrich) est un inhibiteur de la fixation de NFκB à l'ADN (Jayakumar et al., 2013) et empêche ainsi la régulation de ses gènes cibles. L'AGL est utilisé à 3 et 10 mg/kg, i.p. (Suebsasana et al., 2009).

La cycloheximide (CHX, Sigma Aldrich) est un inhibiteur de la synthèse protéique *de novo* par son action inhibitrice de l'initiation et l'élongation de la traduction eucaryote (Schneider-Poetsch et al., 2010). Le CHX est utilisé à 2,2 mg/kg, i.p. (Dunbar and Taylor, 2016).

Tous les agents pharmacologiques dilués dans le solvant DMSO sont injectés en i.p. à un volume de 200µL/100g de poids corporel.

1.3 La chirurgie : implantation d'un cathéter à demeure dans la veine jugulaire

Deux semaines après leur arrivée, les rats sont opérés dans le but d'implanter un cathéter à demeure permettant des injections i.v. quotidiennes. A noter que la veille du début des chirurgies, les rats sont isolés et resteront ainsi isolés 5 à 8 jours après la chirurgie.

1.3.1 L'implant

Les implants (**Figure MM1**) sont tous constitués d'un guide-canule (23-gauge) contenant un pas de vis recourbée à 90°, d'un cathéter de silicone (0.025" X 0.047" X 0.011", SILASTIC®, Plastic Ones, Phymep) de 12 cm de long doublé à l'intersection avec la canule et d'une butée en silicone située à 3,6 cm à l'extrémité. De plus, afin que l'implant puisse être stable dans le dos de l'animal, l'ensemble est fixé à une maille de polypropylène (3 x 3 cm, Ethicon, Treillis Prolene™) par une résine de ciment dentaire (Paladur®, Heraeus). Une fois terminés, les implants sont immergés dans de l'éthanol 70%, 2 à 3 h, et à nouveau au minimum 30 min avant la chirurgie.

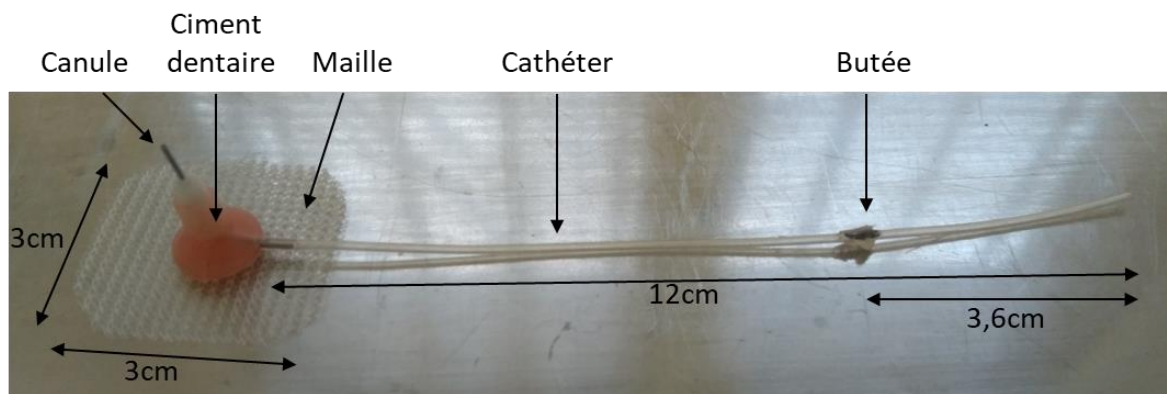


Figure MM1 : Implants pour l'injection i.v. construits et utilisés pour toutes les expériences.

1.3.2 L'anesthésie et l'analgésie

Les rats sont anesthésiés par un mélange de kétamine (90 mg/kg, Imalgene 1000, Merial) / xylazine (10 mg/kg, Rompun® 2%, Bayer) injecté par voie i.p. à un volume de 200 μ L/100g de poids corporel. À la suite de l'induction d'une anesthésie chirurgicale, les rats reçoivent par voie sous-cutanée (s.c.) une injection d'un anti-inflammatoire (méloxicam 1 mg/kg, Metacam®, Boehringer Ingelheim), ainsi que d'un anesthésiant local (lidocaïne 1 mg/kg, Lurocaïne, Vétoquinol), au niveau des deux sites d'ouverture.

1.3.3 La procédure chirurgicale

Les rats sont tondus afin de dégager la peau sur le flanc et le dos. Un gel ophtalmique (Lubrital, Dechra) est appliqué sur les yeux. Après désinfection à l'aide d'éthanol 70% et d'antiseptique (digluconate de chlorhexidine, Septivon, Omega pharma), les animaux sont placés sur un coussin chauffant. Une ouverture sous-cutanée (s.c.) au niveau du dos est réalisée. Après rasage du cou, une petite ouverture est effectuée et la veine jugulaire droite est dégagée. L'extrémité du cathéter de l'implant est ramenée au niveau du cou grâce à un passage sous-cutané. Au niveau du dos, la canule de l'implant est externalisée. L'implant est ensuite placé dans l'ouverture s.c. du dos en veillant à ce que la maille reste bien à plat. Au niveau du cou, après placement de deux fils (5:0 #FK890 Ethicon) autour de la veine et la fermeture du flux sanguin, une hémisection est effectuée afin d'y insérer le cathéter jusqu'à la butée. Les fils sont ensuite refermés autour du cathéter afin de le maintenir dans la veine. Les deux incisions (du cou et du flanc) sont ensuite refermées par les points de suture (3:0 #K882H Ethicon) simples doublés. Les animaux sont réhydratés par l'injection de 3 mL de NaCl 0,9% à 37°C suivie d'une injection i.v. de l'anticoagulant (20 UI, Héparine Choay®, Sanofi). Enfin, les différentes

incisions sont désinfectées (Septivon) et une crème cicatrisante est appliquée (Cicaplast Gel B5, La Roche-Posay). Les animaux sont ensuite placés dans une cage de stabulation sur un coussin chauffant jusqu'au réveil puis remis dans la salle de stabulation, en cage individuelle.

1.3.4 Soins post-opératoires

A la suite de la chirurgie, les rats sont isolés entre 5 et 8 jours le temps qu'ils récupèrent et cicatrisent. Ils sont ensuite mis en colonie (4, exp 2 et 3) ou binôme (exp 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 et 11). La récupération des rats est vérifiée quotidiennement. Dès le lendemain de la chirurgie et jusqu'à la fin de l'expérience, les rats reçoivent, quotidiennement, une injection d'héparine (20 UI, i.v.) afin de maintenir la fluidité des cathéters.

2 Expériences comportementales

2.1 L'auto-administration intraveineuse de cocaïne

Dans cette section toutes les étapes en auto-administration i.v. (AAiv) sont détaillées mais leur enchaînement dépend des différents paradigmes et protocoles utilisés au long de l'étude (voir partie 2.4 **Figure MM5** explicitant les différents protocoles utilisés et l'enchaînement des différentes étapes).

2.1.1 La boîte opérante

Nous possédons 8 boîtes de conditionnement opérant (**Figure MM2**) fabriquées au laboratoire et contrôlées par un programme LabView® (National Instruments) par l'intermédiaire d'une carte digitale (DIO-24, National Instruments). Les boîtes (20 x 20 x 30 cm) possèdent deux orifices (\varnothing 2,5 cm) donnant vers l'extérieur. A l'intérieur de ces orifices, deux cellules photoélectriques permettant l'établissement d'un faisceau. Quand celui-ci est coupé par le museau du rat, on parle de « nose-poke » ou « NP ». Deux portes coulissantes permettent de bloquer les orifices avant et après la session. Au-dessus de chacun des orifices se trouve une LED (lumières clignotantes 1,5 Hz) qui signale l'injection de cocaïne. Au niveau du mur opposé deux autres LED (lumières de la chambre) signalent la période réfractaire. Au centre de la boîte un ressort protège le cathéter d'injection relié aux rats. Le ressort est branché à une poulie qui permet de suivre les rats dans tous leurs mouvements. Le cathéter d'injection est relié à une canule tournante branchée à une seringue de 10 mL contenant la cocaïne. La seringue est placée dans un pousse seringue / pompe (Imetronic®) qui permet l'injection d'un

volume précis (0,06 mL pendant 2s). Le logiciel comptabilise tous les NP ainsi que le nombre d'injections tout le long de chaque session.

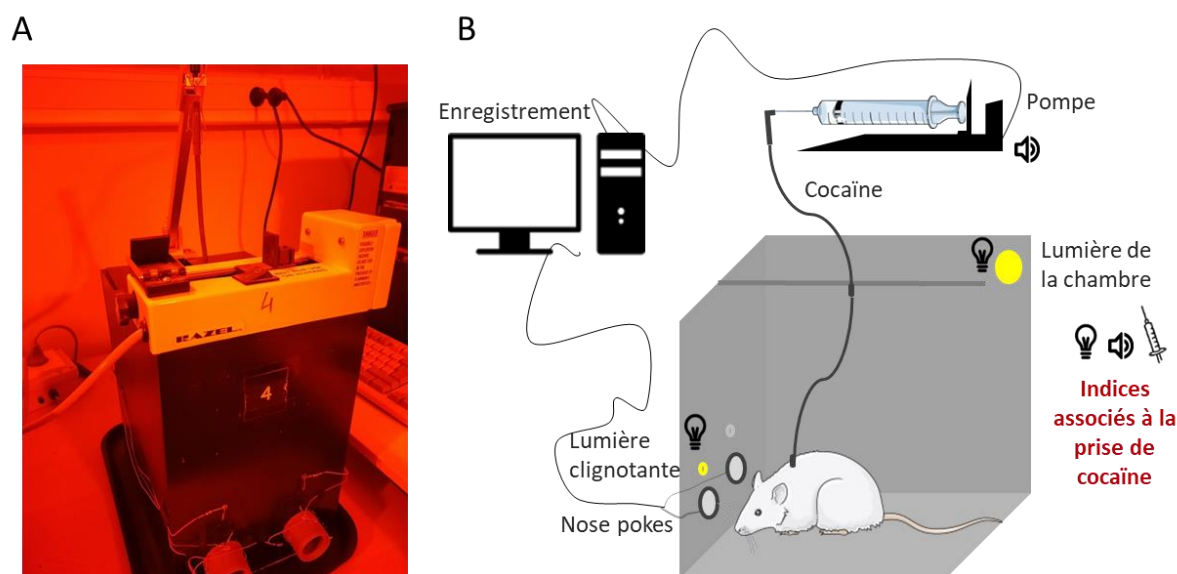


Figure MM2 : Boîtes de conditionnement opérant utilisées (A) photo et (B) schéma

2.1.2 L'acquisition

Toutes les sessions pour un même rat se déroulent quotidiennement à la même heure et dans la même boîte opérante. Les sessions durent de 1 h 45 (exp 4, 5 et 6) à 2 h (exp 1, 2, 3, 10 et 11) selon les protocoles. La répartition des orifices actifs (droite ou gauche) est contrebalancée entre les animaux. Un rat faisant un NP dans son orifice actif (aNP) déclenche une injection de cocaïne à 0,33 mg/kg/injection pendant 2s, l'allumage de l'indice lumineux clignotant situé au-dessus de l'orifice pendant 5s, suivie de l'allumage de la lumière de la chambre pendant 35s. Au total, durant la présentation de tous ces indices, une période réfractaire de 40s est respectée. En revanche, le déclenchement d'un NP dans l'orifice inactif (iNP) n'a aucune conséquence programmée. Pendant la période réfractaire, tous les NP sont comptabilisés mais aucun n'entraîne d'injection de cocaïne ni de présentation d'indices supplémentaires.

Les rats s'auto-administrent en programme de renforcement à ratio fixe 1 (FR1) ou ratio fixe 5 (FR5), selon le protocole suivi (**Figure MM11**), c'est-à-dire qu'il faudra 1 (ou 5) NP d'affilés dans l'orifice actif pour déclencher l'injection et la présentation des indices. Au fil des sessions et des jours, les rats stabilisent leur nombre de aNP et donc d'injections. Seuls les animaux réalisant au minimum 30 injections par session et aillant un pourcentage de aNP/iNP supérieur à 70% sont maintenu dans l'expérience.

2.1.3 *La dose-réponse en ratio fixe*

Lors des sessions de dose-réponse en ratio fixe (FR), les paramètres sont les mêmes que durant l'acquisition avec pour seule variation les doses de cocaïne injectées. Cette étape nous permet de mesurer la réponse des rats à différentes doses de cocaïne (0,087 ; 0,175 ; 0,25 ; 0,33 ; 0,75 mg/kg/injection). Les différentes doses sont testées pendant plusieurs sessions successives en suivant un enchaînement de type carré-latin entre les rats.

2.1.4 *La dose-réponse en ratio progressif*

Lors des sessions de dose-réponse en ratio progressif (PR), les paramètres sont les mêmes que durant la dose-réponse en ratio fixe à l'exception que le nombre de aNP nécessaire pour l'obtention d'une injection de cocaïne augmente au cours de la session ($aNPs = 5e^{0.2*n} - 5$, où n correspond au rang de l'injection). Un « cut-off » de 1 h sans aucune nouvelle injection est respecté sur une session qui peut durer au maximum 5 h.

2.1.5 *L'extinction instrumentale*

Lors des sessions d'extinction instrumentale, les rats sont, de la même manière que durant l'acquisition, placés quotidiennement à la même heure et dans les mêmes boîtes opérantes. En revanche, durant ces sessions, tous les NP dans les orifices actif et inactif n'entraînent aucune conséquence programmée. Au fil des sessions et des jours, les rats vont significativement diminuer leur comportement de recherche. Cette étape est validée pour les rats faisant moins de 25% de NP par rapport au premier jour d'extinction.

2.1.6 *L'abstinence forcée*

Lors d'une période d'abstinence forcée, les rats ne sont plus placés dans les boîtes opérantes mais sont maintenus dans leur cage de stabulation. Ils sont tout de même manipulés quotidiennement et reçoivent les injections d'héparine (20 UI, i.v.) afin de maintenir les cathéters fluides.

2.1.7 *Réactivation des souvenirs associés aux indices*

Le protocole d'AA adapté pour l'étude de la mémoire associée à la prise de cocaïne a été mis en place en se basant sur les articles de littérature notamment ceux de l'équipe du docteur Mary M. Tor-

regrossa (University of Pittsburg, Bender and Torregrossa, 2021; Torregrossa et al., 2010). De plus, le protocole définitif utilisé pour les expériences a été élaboré à la suite d'une première expérience pilote pendant laquelle plusieurs paramètres ont été testés. Ainsi, celle-ci a montré l'importance d'avoir une période réfractaire de 40s signalée par la lumière de la chambre et le placement de la pompe d'injection directement sur le couvercle des boîtes opérantes pour optimiser l'association des multiples indices aux effets de la cocaïne.

Il existe deux versions de réactivation des souvenirs selon que les rats passent en protocole d'extinction instrumentale ou d'abstinence forcée (**Figure MM3**).

Dans le cas où les rats ont précédemment eu une extinction instrumentale (**Figure MM3B**), la réactivation des souvenirs se fait dans une boîte opérante avec une nouvelle conformation (contexte B). Le contexte B diffère du contexte A (d'acquisition) par de multiples points (grillage sur les murs, copeaux de bois sur le sol, les portes coulissantes obstruent les orifices des NP et ont une texture de « moquette » différentes de leur aspect lisse habituel) (**Figure MM3A**). Afin de s'affranchir d'un effet de stress provoqué par ce nouvel environnement, les rats sont préalablement habitués à ce nouveau contexte 24 h avant la session de réactivation, pendant 1 h. Lors de la session de réactivation, les rats sont placés dans les boîtes opérantes lors d'une session courte de 10 min. Après 5 min, les rats reçoivent 4 présentations de l'enchaînement de tous les indices (injection de 0,06 mL de NaCl 0,9%, sons de la pompe activée, 5s de lumière clignotante, suivie de 35s de lumière de la chambre). Les enchaînements de ces présentations sont séparés de 30s. Le nombre de quatre présentations a été choisi, car celui-ci permet de réactiver le souvenir associé sans risque d'éteindre sa valeur prédictive (Rich et al., 2016; Sorg et al., 2015). A noter, que les orifices sont bloqués et non accessibles tout le long de ces deux sessions (habituation et réactivation).

Dans le cas d'une réactivation après une abstinence forcée (**Figure MM3C**), la réactivation des souvenirs se fait dans leur boîte opérante qui se trouve dans la même configuration que lors de l'acquisition (contexte A). En effet, dans ce cas de figure, il est important de garder le même contexte lors de la réactivation. Ici, il sera impossible d'étudier la mémoire des indices uniquement, car ni le contexte ni le comportement instrumentalisé n'ont été éteint. Le protocole de réactivation par la présentation à quatre reprises de l'enchaînement des indices s'effectue de la même manière que détaillé précédemment.

Cette réactivation permet de déclencher un processus de reconsolidation qui s'étend jusqu'à quelques heures après le rappel. Les différents traitements pharmacologiques ont donc été réalisés immédiatement après cette session de réactivation afin d'agir durant la période de reconsolidation.

2.1.8 *La réinstallation induite par les indices*

Lors d'une session unique, les rats sont placés dans les boîtes opérantes à la même heure qu'habituellement. Durant cette session, tous les aNP déclenchent la présentation de tous les indices (lumière clignotante, lumière de la chambre, sons de la pompe et injection d'un volume équivalent de NaCl 0,9% en absence de cocaïne). En revanche, de la même manière que pendant l'acquisition, les iNP n'entraînent aucune conséquence programmée.

2.2 L'actographie

L'actographie permet la mesure d'un indice de la locomotion des animaux. Pour cela, deux faisceaux infrarouges sont placés autour d'une cage standard de stabulation (36,5 x 22,01 x 18 cm) à l'aide de cellules photoélectriques séparées de 22,8 x 28,6 cm (**Figure MM4A**). Le nombre de fois que l'animal traverse les deux faisceaux (photobeam) est comptabilisé par l'ordinateur pendant un temps donné. Ici, les actographies ont été réalisées pendant les périodes d'obscurité dans une salle sous lumière rouge. Les rats ont été habitués 2 h dans la salle d'actographie avant l'expérience. Puis, les rats sont isolés dans les cages d'actographie, ils ont au minimum 2 h pour s'habituer à cette cage jusqu'à atteindre un état de locomotion basal. Ensuite, les effets de l'injection d'un agent pharmacologique sur l'activité locomotrice peuvent être mesurés en évaluant le nombre de « photobeam » c'est-à-dire le nombre de fois que l'animal traverse les deux faisceaux infrarouges.

2.3 Le labyrinthe en croix surélevé

Le test du labyrinthe en croix surélevé (elevated plus maze) permet de mesurer un indice du niveau d'anxiété. Ce labyrinthe est composé de 4 bras (2 ouverts et 2 fermés, 50 x 10,2 cm) élevés (81 cm du sol) ainsi que d'une zone centrale (**Figure MM4B**). Il est considéré que les bras ouverts sont plus anxiogènes pour les rats qui resteront donc préférentiellement dans les bras fermés. Une comparaison

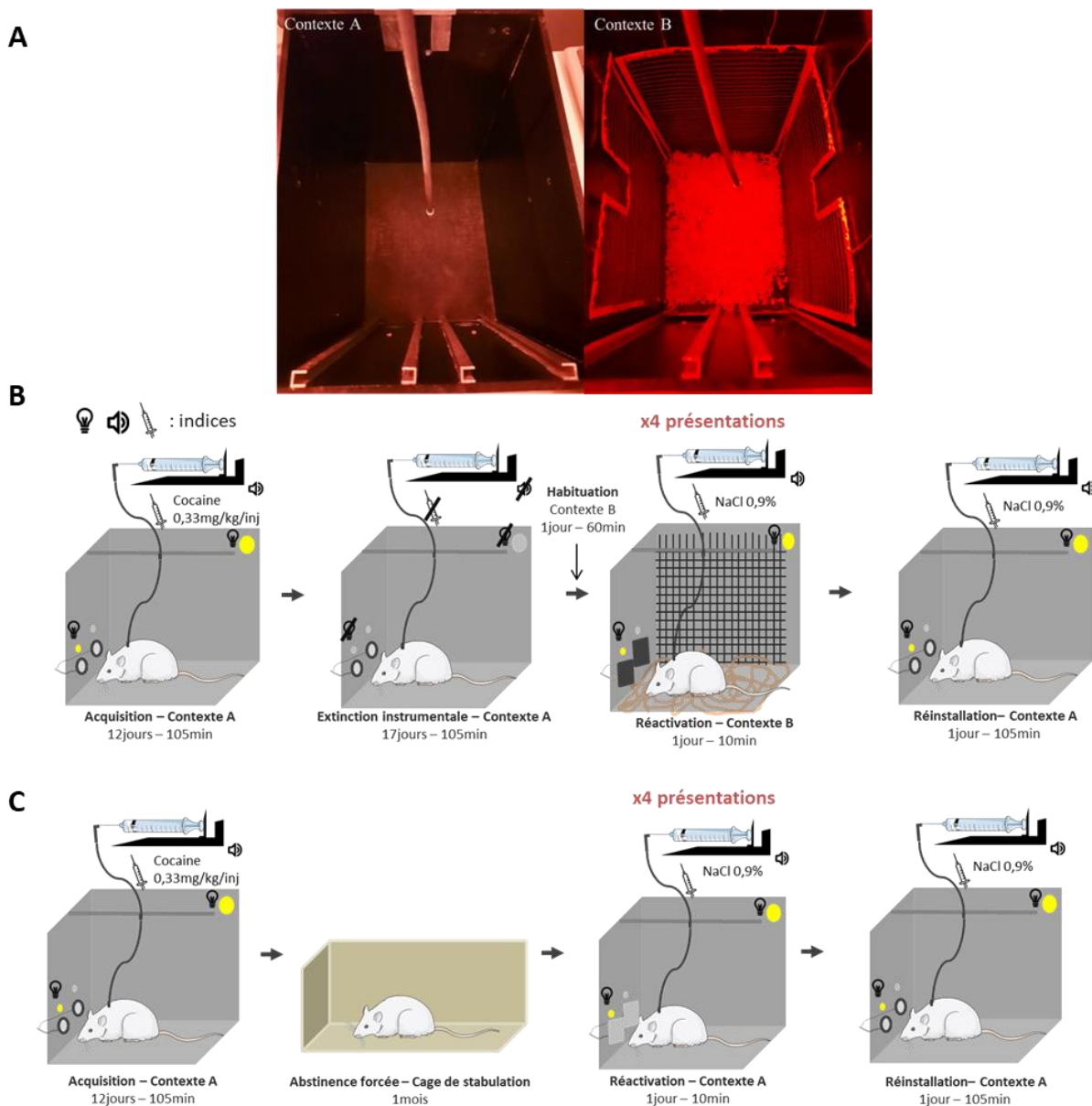


Figure MM3 : Protocole d'AA adapté à l'étude de la mémoire associée à la prise de cocaïne. **(A)** Boîtes opérantes en contexte A *versus* contexte B. **(B)** Protocole d'AA dans le cas d'une extinction instrumentale. **(C)** Protocole d'AA dans le cas d'une abstinence forcée.

du pourcentage de temps passé dans chacun de ces compartiments et du nombre d'entrées dans les bras ouverts seront donc des indices de l'état d'anxiété de l'animal. La mesure de cet indice se fait lors d'une session unique de 5 min. La luminosité de la salle est précisément contrôlée pour que celle-ci soit de 10 lux à l'extrémité des bras ouverts, 7 lux au centre et de 4 lux dans les bras fermés. Les rats sont disposés au centre du labyrinthe avec l'orientation de leur museau variable entre les deux différents bras fermés (est ou ouest). La session est comptabilisée à distance par l'expérimentateur avec une caméra placée au-dessus du labyrinthe. Ainsi, le déplacement de l'animal dans le labyrinthe est calculé par l'expérimentateur (nombre d'entrée et cumulatif du temps passé

dans chacune des zones). A noter qu'une entrée dans l'un de ces compartiments est déterminée quand les quatre pattes de l'animal s'y trouvent.

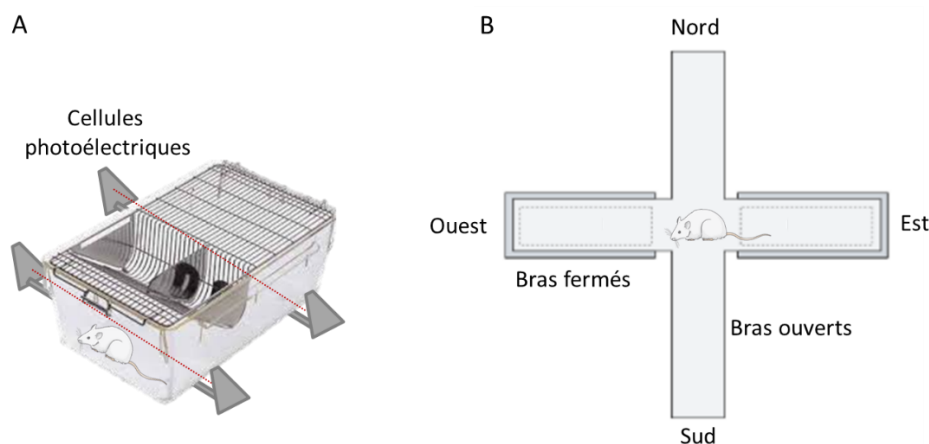
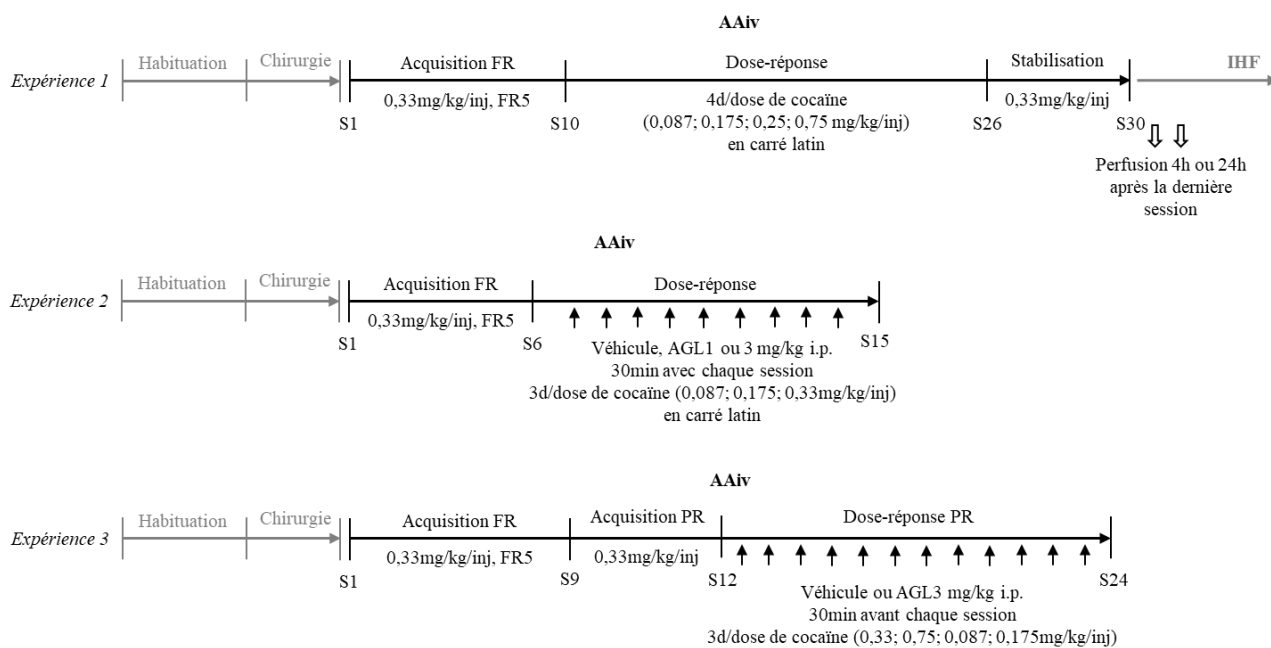


Figure MM4 : Tests comportementaux de locomotion et d'anxiété. (A) Actographie. (B) Labyrinthe en croix surélevé

2.4 Récapitulatif de l'ensemble des protocoles expérimentaux



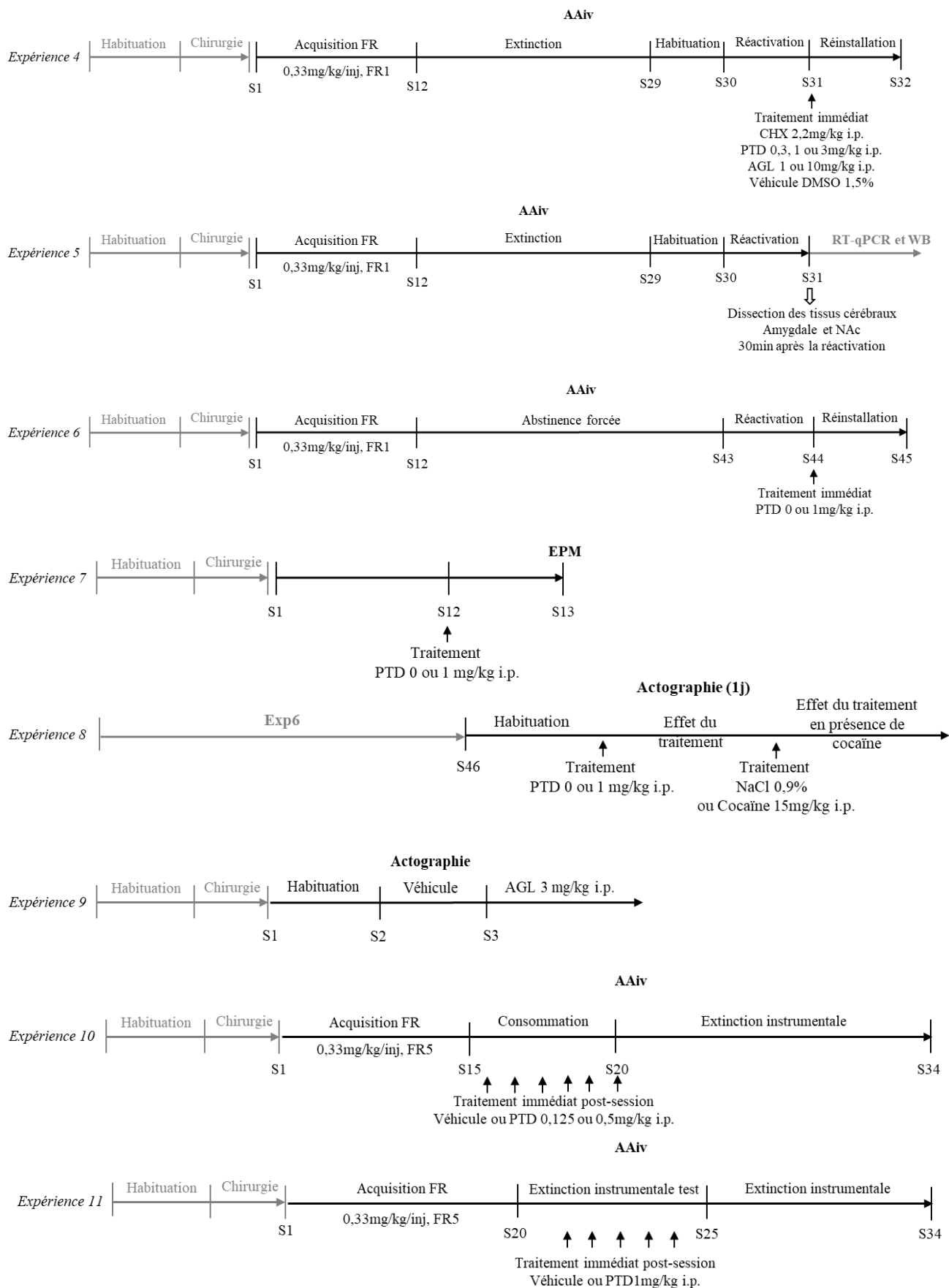


Figure MM5 : Décours temporels des expériences de consommation et recherche de cocaïne. *Exp1-3 : Article I, Exp4-6 : Article II et Exp7-11 : Supplémentaires en annexe*

3 Prélèvement des tissus cérébraux

3.1 Anesthésiques

Au cours de ma thèse, deux anesthésiques ont été utilisés pour la mise à mort des animaux du fait de l'évolution de la législation.

Les rats sont mis à mort par injection i.v. de pentobarbital sodique permettant une induction de l'anesthésie et de la mort en 3 à 5s. Dans le cadre de la perfusion intracardiaque, les rats ont reçu 500 mg/kg de Doléthal® (Vétoquinol), alors que dans le cadre des prélèvements de tissus frais, les rats ont reçu 182 mg/mL d'Euthasol® Vet (Dechra).

3.2 Perfusion intracardiaque et congélation des cerveaux

À la suite de l'induction de l'anesthésie profonde, les rats sont placés sous une hotte ventilée. Une ouverture de leur cavité thoracique est effectuée afin de dégager le cœur. A l'aide d'une pince hémostatique, l'artère descendante est bloquée dans le dos de l'animal. Une canule d'injection est ensuite insérée dans le ventricule gauche et une ouverture est réalisée dans l'oreillette droite. La canule d'injection reliée à une pompe permet un flux d'entrée de liquide de (10 mL/min). Pendant les 5 premières minutes du PBS (environ 50 mL) est injecté afin d'enlever tout le sang de l'organisme. Puis, pendant les 10min suivantes, du paraformaldéhyde 4% (PFA 4%, environ 100 mL) dilué dans du PBS est injecté afin de fixer les tissus, et donc le cerveau. Par la suite, les rats sont décapités. Les cerveaux sont récupérés et placés dans un bain de PFA 4% pendant 2 h à 4°C. Les cerveaux sont incubés pendant 48 h dans du sucrose 20% à 4°C. Ils sont ensuite congelés en les plaçant dans l'isopentane maintenu à $-40^{\circ}\text{C}\pm 5$ pendant 1 min puis conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

3.3 Prélèvement des tissus frais

A la suite de l'induction de la mort de l'animal, ceux-ci sont décapités et les cerveaux récupérés. Ces cerveaux sont immédiatement placés dans une solution de NaCl 0,9% à 4°C afin d'enlever tous les résidus de sang. Ils sont ensuite rapidement placés sur une plaque de verre maintenue froide par de l'azote liquide. Le cerveau est découpé à l'aide d'une lame de rasoir. Les structures découpées sont (**Figure MM6**) : le dmPFC entre +4.20 et +3.20 mm, le NAc entre +3.20 et 1.00 mm, l'hippocampe

dorsal et l'amygdale entre -1.60 et -3.80 mm. Les tubes Eppendorf contenant les structures sont ensuite immédiatement plongés dans l'azote liquide afin d'assurer une congélation rapide. Ceux-ci sont ensuite conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

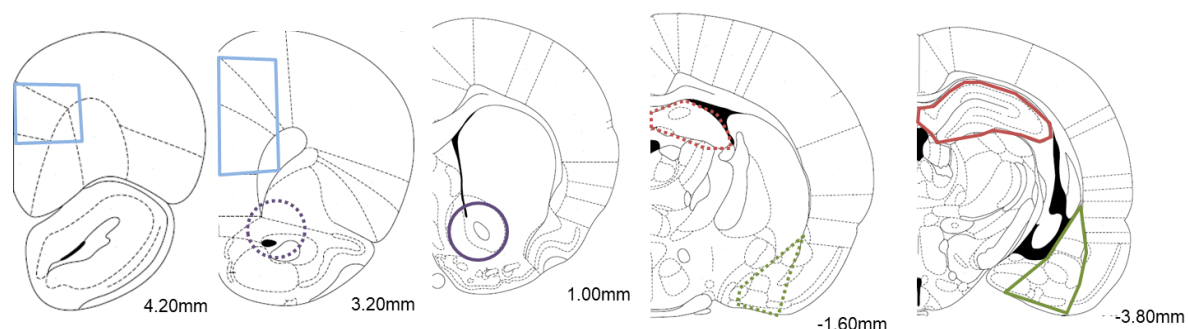


Figure MM6 : Délimitation schématique des dissections des structures d'intérêts. *Bleu* : cortex préfrontal médian dorsal (*dmPFC*), *Violet* : *NAc*, *Rouge* : hippocampe dorsal et *vert* : amygdale. Distance d'après l'atlas Paxinos et Watson 1998 édition Rat

4 Expériences moléculaires

4.1 Marquage sur tissus perfusé

4.1.1 Découpe des cerveaux

Les cerveaux conservés à -80°C sont découpés à l'aide d'un cryostat (Leica, HM560) dont l'enceinte est maintenue à -20°C. Les cerveaux sont fixés à un porte objet par le biais d'un milieu de fixation qui se solidifie à -20°C, le Cryomount (#00890, HistoLab®). Les cerveaux sont coupés à une épaisseur de 40 µm.

Les coupes sont récupérées au fur et à mesure dans les puits d'une plaque 24 puits (2 plaques par rat) préalablement remplis de 500 µL de cryoprotectant (NaH₂PO₄ 0,785 mg, Na₂HPO₄ 2,725 mg, Ethylène glycol 0,15 mL, Glycérol 0,15 mL, Eau ultra pure 0,2 mL) dans chacun des puits. Toutes les coupes sont récupérées en série suivant le plan de plaque (**Figure MM7**). Par ailleurs, les coupes sont réparties par « bloc » c'est-à-dire par structures. Cette répartition nous permet d'avoir un échantillonnage représentatif antéro-postérieur intégral (environ tous les 360 µm) d'une structure donnée.

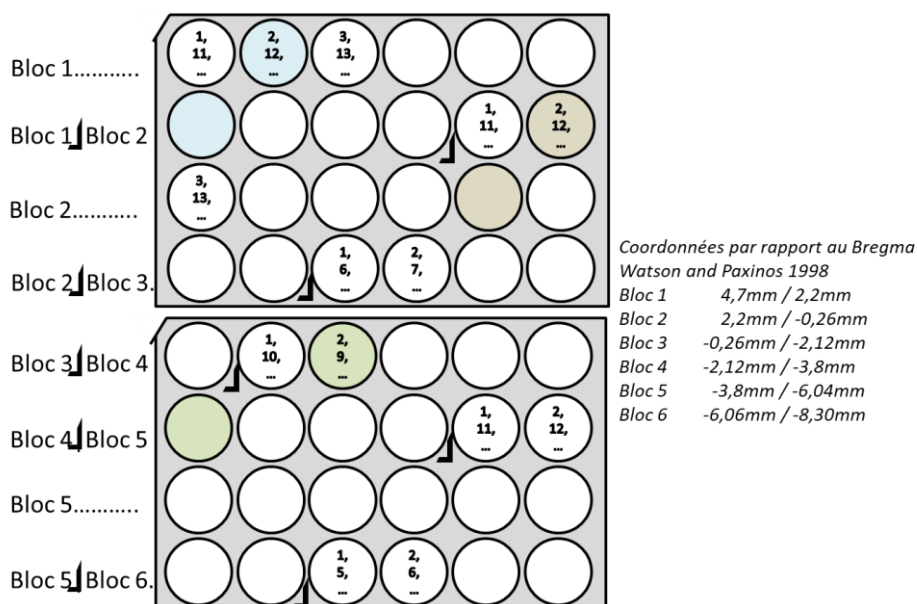


Figure MM7 : Organisation de la répartition des coupes dans les plaques. Les numéros correspondent au numéro des coupes récupérées. Celles-ci sont réparties en série le long des puits du bloc correspondant. Une fois tous les puits complétés la répartition recommence au début des puits du bloc. Ceci permet d'avoir dans chaque puits un échantillonnage complet de toute la structure d'environ 360 μ m. Les puits colorés sont les puits utilisés pour les analyses d'immunohistofluorescence.

4.1.2 Immunohistofluorescence

Les expériences d'immunohistofluorescence (IHF) ont été réalisées sur coupes flottantes. Les coupes de deux puits à distance équivalente pour chaque structure sont récupérées (**Figure MM7**). Toutes les étapes de l'IHF sont réalisées à température ambiante. Les coupes sont lavées à trois reprises au PBS. Elles sont ensuite incubées pendant 1 h dans d'une solution de blocage (PBS + Triton X-100 0,5% + sérum de cheval 5%). Les coupes sont ensuite incubées toute la nuit en présence de l'anticorps primaire dilué au 1:1000 dans le diluant (PBS + Triton X-100 0,5%). Le lendemain, après trois lavages au PBS, les coupes sont incubées 2h en présence de l'anticorps secondaire d'âne anti-souris conjugué à un Alexa-fluor488 dilué au 1:1000 dans le diluant. A la suite, les coupes sont incubées 10min dans une solution de DAPI dilué au 1:2000 dans du PBS.

Pour finir, les coupes sont montées sur lames préalablement gélatinées et après séchage de ces coupes sur les lames, celles-ci sont rincées à l'eau ultra pure. Enfin, une fois les coupes sèches, les lamelles sont montées sur les lames à l'aide de 200 μ L de milieu fixateur Mowiol® (Sigma Aldrich #81381). Les lames sont laissées au minimum 1 h à sécher à température ambiante avant d'être conservées à 4°C et scannées.

	Cible	Espèce	Dilution	Référence
Anticorps primaire	p-NFκB p65 (27.Ser 536)	Souris	1:1000	sc-136548
Anticorps secondaire	Anti-souris AlexaFluor488	Âne	1:1000	R-37114

Tableau MM1 : Liste des anticorps utilisés pour l'IHF

4.1.3 Imagerie au Nanozoomer

Toutes les lames préalablement nettoyées à l'éthanol 70% sont scannées à l'aide d'un Nanozoomer S60 (Hamamatsu Photonics) disponible à la plateforme de l'INCI (Institut des neurosciences cellulaires et intégratives, Strasbourg, France). Les images sont acquises avec une résolution de 20x par deux filtres, DAPI et FITC. Le temps d'exposition total est le même pour toutes les lames d'une même structure. En effet, celui-ci est adapté pour chaque IHF afin que le marquage soit suffisant et le bruit de fond réduit. L'IHF p-NFκBp65 résulte en un marquage nucléaire co-localisant avec le marquage DAPI.

4.1.4 Comptage

Le comptage est réalisé en plusieurs étapes :

Premièrement, les structures cérébrales d'intérêts sont délimitées à l'aide de l'atlas Paxinos et Watson 1998 édition Rat sur le logiciel NDP.view (**Figure MM8**). Ce logiciel nous donne l'aire en mm² de chaque structure délimitée.

Deuxièmement, les images de chaque structure sont extraites en format .jpeg depuis le logiciel NDP.view suivant des paramètres identiques (agrandissement, contraste, correction gamma, luminosité). Le seuil de luminosité est déterminé pour chaque structure (et donc chaque IHF) afin de s'affranchir du bruit de fond.

Troisièmement, les images extraites sont analysées par le module « spot detector » du logiciel Icy (développé par l'institut Pasteur) après avoir préalablement été mises en niveau de gris. Ce module permet de comptabiliser le marquage nucléaire « positif » selon les critères établis, identiques pour tous les animaux. Ainsi, seul des marquages de 3 pixels minimum et ayant une intensité arbitraire minimale sont comptés positifs.

Cette technique nous permet à terme de compter une densité : nombre de noyaux p-NFκBp65 positifs / mm² pour chaque coupe. Une moyenne pour chaque animal est ensuite calculée pour chaque structure. Pour finir, la moyenne du nombre de noyaux p-NFκBp65 positifs / mm² de tous les animaux d'un même groupe de traitement est établie et comparée entre les groupes.

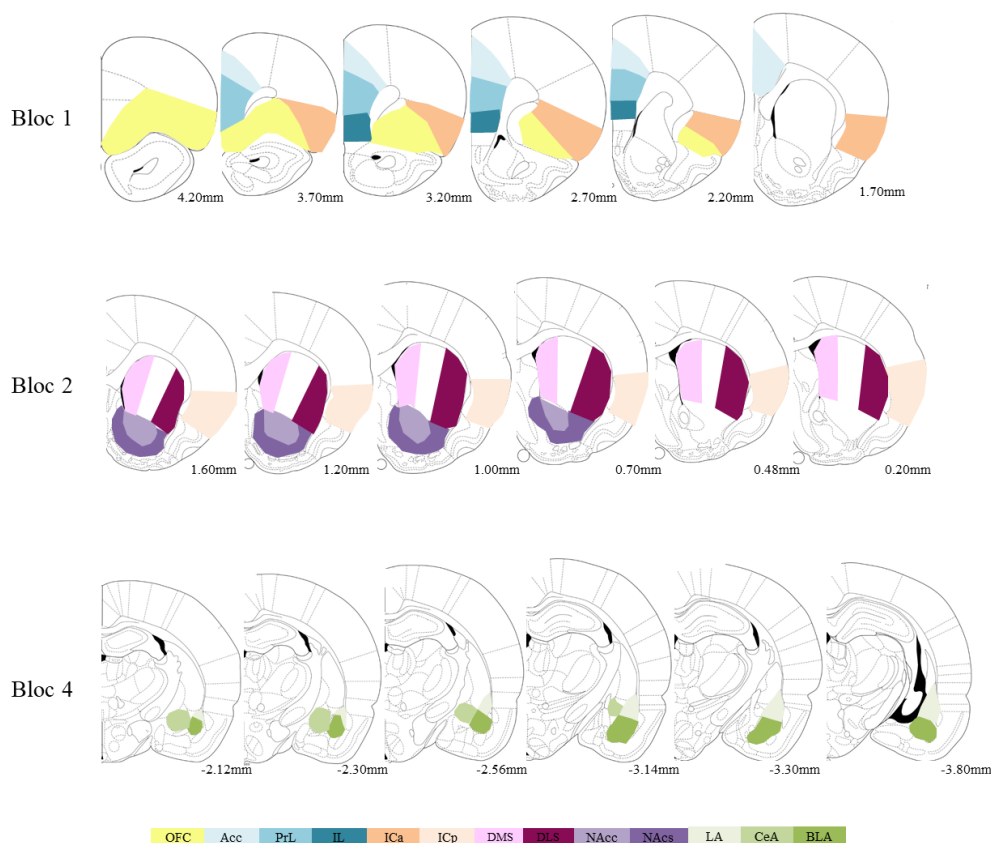


Figure MM8 : Délimitation des structures d'intérêt pour le comptage en IHF. *OFC* : cortex orbitofrontal, *ACC* : cortex cingulaire antérieur, *PrL* : cortex prélimbique, *IL* : cortex infralimbique, *Ins a* : cortex insulaire antérieur, *Ins p* : cortex insulaire postérieur, *DMS* : striatum dorsal médian, *DLS* : striatum dorsal latéral, *NAcc* : noyau accumbens core, *NAcS* : noyau accumbens shell, *CA1* : corne d'Ammon de l'hippocampe air 1, *CA3* : corne d'Ammon de l'hippocampe air 3, *DG* : gyrus denté, *LA* : amygdale latérale, *CeA* : amygdale centrale, *BLA* amygdale basolatérale.

4.2 Mesure des niveaux d'ARN totaux

Ces analyses sont effectuées sur la moitié des tissus de chaque structure. En effet, afin de diminuer le nombre d'animaux nécessaires, les mêmes animaux sont utilisés pour les analyses d'ARN et de protéines. Pour cela, les tissus sont placés sur une plaque de verre refroidie sur de la carboglace et sont rapidement écrasés, homogénéisés et séparés en deux à l'aide de deux lames de rasoirs stériles.

4.2.1 *Extraction des ARN*

La moitié des tissus cérébraux pour l'étude des ARN est placé dans 1 mL de RiboZol™ (VWR life science). Le tissu est ensuite homogénéisé dans le RiboZol™ à l'aide d'un potter directement dans le

tube Eppendorf sous une hotte ventilée. Les homogénats sont incubés 10 min à température ambiante. Ensuite, 200 μL de chloroforme est ajouté dans chaque tube et mélangé par retournements (10-15) avant d'être incubé 3 min à température ambiante. Les tubes sont ensuite centrifugés à 12 000g à 4°C pendant 10 min. Le surnageant, d'environ 400 μL , est récupéré dans un nouveau tube Eppendorf et 500 μL d'isopropanol y sont ajoutés et mélangés par retournements (10-15) avant d'être incubés 10 min à température ambiante. Les tubes sont centrifugés à 12 000 g à 4°C pendant 15 min. Cette fois-ci, les ARN se trouvent dans les culots, ainsi les surnageants sont éliminés par retournement. Afin de laver les ARN obtenus, deux lavages à l'éthanol 75% sont effectués c'est-à-dire, dans les deux cas, 1 mL d'éthanol suivi d'une centrifugation à 12 000 g à 4°C pendant 2 min et élimination des surnageants par retournements. Les culots finalement obtenus sont mis à sécher en ouvrant les tubes Eppendorf retournés sur la paillasse pendant 45 min. Finalement, les ARN sont repris dans 40 μL (amygdale) ou 20 μL (NAc) d'eau ultra pure et incubés au bain-marie à 60°C pendant 5min. Les échantillons d'ARN sont conservés au -20°C ou -80°C jusqu'à leur utilisation.

4.2.2 Dosage des ARN

Les concentrations en ARN de tous les échantillons sont mesurées à l'aide d'un NanoVue™ plus spectrophotometer (Biochrom, Fisher Scientific). Pour cela, après avoir fait le blanc avec la même eau ultra pure utilisée pour la dissolution des ARN, 2 μL des échantillons sont placés sur la cellule de mesure. Le NanoVue™ nous donne la concentration en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ par le biais d'une mesure de longueur d'onde 260 nm ainsi que les rapports 260/280 nm et 260/230 nm. Sur l'ensemble des échantillons une concentration moyenne de 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L} \pm 0,015$ d'ARN est obtenue pour les amygdales dans un volume final de 40 μL et 0,09 $\mu\text{g}/\mu\text{L} \pm 0,007$ dans un volume final de 20 μL pour les NAc. Les rapports de DO sont tous $>1,8$.

4.2.3 Transcription inverse

Les ARN extraits sont rétro-transcrits en brin ADN complémentaire (ADNc), en utilisant le kit «iScript Reverse Transcriptase SuperMix» (Biorad). Pour cela, 750 ng d'ARN sont utilisés comme matrice. A cela, 4 μL de «5x iScript Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR» (Biorad, #1708841) sont ajoutés pour chaque échantillon. Les mélanges réactionnels sont ensuite complétés à l'eau ultra pure pour atteindre un volume final de 20 μL . Les échantillons sont placés dans un «Biometra Thermocycler T-Gradient ThermoBlock» (American Laboratory Trading) et la réaction est lancée, 5 min à 25°C, 30 min à 42°C et stoppée 5 min à 85°C. Les échantillons d'ADNc sont conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

4.2.4 *Elaboration et préparation des amorces*

Afin d'élaborer les séquences des couples d'amorces, les séquences ADNc correspondant aux gènes cibles sont recherchées à l'aide du site NCBI section « Nucleotide ». La section « Primer-BLAST » du site NCBI permet de trouver des amorces sens et anti-sens selon des caractéristiques précises. Ici, on impose que les amorces soient pour le rat (*Rattus norvegicus* (taxid:10116)) d'environ 20 paires de bases correspondant à la production d'un amplicon de taille allant de 70 pb à 200 pb, la température d'hybridation des amorces doit être de $62^{\circ}\text{C}\pm 2$, le pourcentage en guanine et cytosine des amorces doit être d'environ 50% et les deux amorces doivent être séparées par au minimum un intron de 200 pb lorsque cela est possible. Les amorces utilisées sont répertoriées dans le **Tableau MM2**. Par la suite, les couples d'amorces reçues de Sigma à la concentration initiale de 100 μM sont diluées au 100^{ème} dans de l'eau ultra pure. Ces couples sont directement dilués dans le même mélange afin d'obtenir une même solution pour les amorces sens et anti-sens d'un même gène cible.

4.2.5 *Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)*

La qPCR est réalisée dans une plaque de 96 puits. Chaque échantillon est amplifié en triplicat. Les qPCR sont réalisées en utilisant le kit « SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green supermix » (Biorad, #172-5275). Pour cela, l'équivalent de 0,5 μL d'ADNc est utilisé comme matrice, dans chaque puit réactionnel, à laquelle sont ajoutés 7,5 μL de « master mix Sybr Green » et 4,5 μL d'eau ultra pure. Une solution pour l'ensemble des puits correspondant à un ADNc est préparée et répartie dans les puits. De plus, l'équivalent de 200 nM/ μL d'amorces sens et anti-sens sont individuellement déposés dans les puits correspondants.

Le gène de référence est *rplp0* (ribosomal protein lateral stalk subunit P0), nommé aussi 36B4 ici, et permet de normaliser les résultats car il est ubiquitaire et son expression n'est pas dépendante de la cocaïne. Les plaques sont placées dans un « CFX96 Connect Real-Time PCR Detection System » (Biorad) et un protocole adapté à la qPCR (**Figure MM9**) est lancé.

Gène	Sens	Séquence 5'-3'	Amplicon
36B4 NM_022402.2	F	CTGCCCGAGCCGGTGCCATC	131 pb
	R	TTCAATGGTACCTCTGGAGAT	
CB2 NM_001164143.3 NM_001164142.3 NM_020543.4	F	AATGGCGGCTTGGAGTTCAA	128 pb
	R	TAGAGCACAGCCACGTTCTC	
IL1a NM_017019.1	F	CCATCCAACCCAGATCAGCA	81 pb
	R	TGAACTCCTGCTTGACGATCC	
IL1b NM_031512.2	F	GGGGAAGTGTGCAGACTCAA	141 pb
	R	CAGCTGGAGAGTGTGGATCC	
IL6 NM_012589.2	F	GCTCTGGTCTTCTGGCGTTCC	93 pb
	R	TGCTCTGAATGACTCTGGCT	
p105 NM_001276711.1	F	TTTGCAACTATGTGGGGCCT	76 pb
	R	TGGGCGTGCAGGTGAATATT	
p65 NM_199267.2	F	CTCATCTTCCCTCAGAGCCAG	185pb
	R	CCCGTGTAGCCATTGATCTTG	
PSD95 NM_019621.1	F	CACCTCCCCAACCAGGCCAAT	94pb
	R	CCTCTGTTCCATTCACCTGCAAC	
TLR4 NM_019178.1	F	TCTGAGCTTCAACCCCTGAA	100 pb
	R	AATTGTCTCAATTCACACCTGGAT	
TNF NM_012675.3	F	GGGCAGGTCTACTTTGGAGTCATTG	128 pb
	R	GGGCTCTGAGGAGTAGACGATAAAG	
Zif268 NM_012551.2	F	TAGGAGCACCTGACCACAGA	91pb
	R	GGGTAGTTTGGCTGGGATAAC	

Tableau MM2 : Liste des amorces utilisées pour les qPCR. *F* : forward, séquence sens, *R* : reverse, séquence anti-sens. *36B4* (ou *RPLR0* ribosomal protein lateral stalk subunit *P0*) : gène de référence, *CB2* : récepteur cannabinoïde 2, *IL1a* : interleukine 1a, *IL1β* : interleukine 1β, *IL6* : interleukine 6, *p105* : précurseur de la sous-unité *p50NFκB*, *p65* : sous-unité *p65 NFκB*, *PSD95* : postsynaptic density protein 95, *TLR4* : toll like receptor 4, *TNF* : tumor necrosis factor, *ZIF268* : zinc finger protein 268

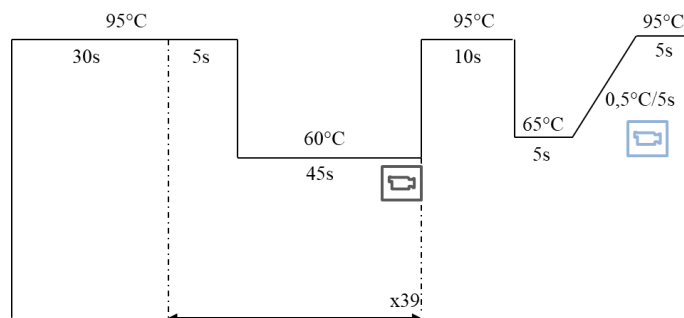



Figure MM9 : Protocole de RT-qPCR

4.2.6 Vérification des amorces

A noter que, les amorces ont préalablement été vérifiées sur des échantillons d'amygdale tests. Pour vérifier l'efficacité des amorces pour le gène cible, nous testons des dilutions en cascade ADNc (1 ; 0,5 ; 0,25 et 0,125 μ L ADNc/puit) pour chaque couple d'amorces (**Figure MM10**). Le protocole qPCR est ensuite utilisé pour amplifier les ADNc de test avec les couples d'amorces à tester. Par la suite, les amplicons sont vérifiés par électrophorèse en gel d'agarose 2%. La spécificité d'un couple d'amorce est validée par la présence un seul pic de fusion (**Figure MM9** ) ainsi que d'une seule bande de migration en gel d'électrophorèse, à la taille attendue de l'amplicon (**Figure MM10D, Tableau MM2**).

4.2.7 Calcul de l'expression des gènes

Afin d'analyser les niveaux d'expression des différents gènes d'intérêts, le nombre de cycle qPCR nécessaire pour atteindre une fluorescence considérée comme suffisante pour détecter la présence du gène, appelé Cq, est utilisé. Les Cq sont déterminés par le logiciel CFX BioRad à l'aide d'un modèle de régression non-linéaire.

$$\Delta Cq_{\text{gène a, rat x}} = Cq_{\text{gène a, rat x}} - Cq_{\text{gène de référence (36B4), rat x}}$$

$$\Delta\Delta Cq_{\text{gène a, rat x}} = \Delta Cq_{\text{gène a, rat x}} - \overline{\Delta Cq}_{\text{gène a, groupe contrôle}}$$

Ces paramètres sont ensuite appliqués en « fold change » dans le but d'obtenir des valeurs relatives de quantification de l'expression des gènes (Livak and Schmittgen, 2001) :

$$\text{Fold change}_{\text{rat x}} = 2^{-\Delta\Delta Cq_{\text{gène a, rat x}}}$$

$$\text{Fold change} = \overline{2^{-\Delta\Delta Cq}_{\text{gène a, groupe}}}$$

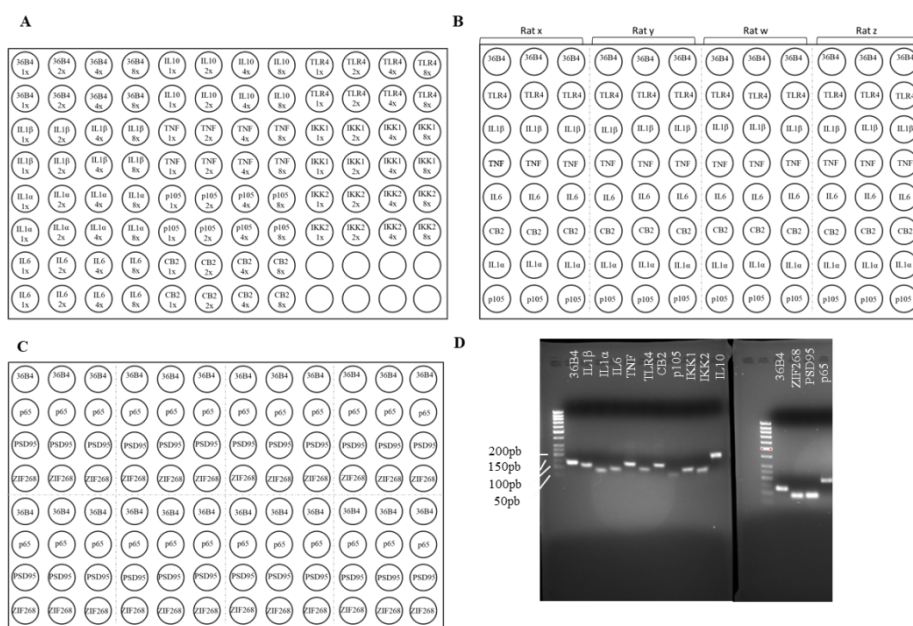


Figure MM10 : Plan d'une microplaque PCR d'exemple de test (A), d'expériences (B et C) et gel d'électrophorèse (D). *Rat x, y, w, et z* correspond à des animaux de groupes de traitements différents répartis aléatoirement sur les plaques. *36B4* (ou *RPLR0*) : gène de référence, *CB2* : récepteur cannabinoïde 2, *IL1 α* : interleukine 1 α , *IL1 β* : interleukine 1 β , *IL6* : interleukine 6, *p105* : précurseur de la sous-unité p50NF κ B, *p65* : sous-unité p65 NF κ B, *PSD95* : postsynaptic density protein 95, *TLR4* : toll like receptor 4, *TNF* : tumor necrosis factor, *ZIF268* : zinc finger protein 268

4.3 Mesure de niveaux protéiques nucléaires et de la liaison à l'ADN de NF κ B

La moitié des tissus de chaque structure utilisée pour les analyses de protéines est placée sur une plaque de verre refroidie sur de la carboglace et sont écrasés, homogénéisés à l'aide de deux lames de rasoirs stériles.

4.3.1 *Extraction des protéines nucléaires*

Les protéines nucléaires des tissus cérébraux des structures d'intérêt (amygdale et NAc) ont été extraites. Ces extractions ont été réalisées en utilisant le kit ab113474 (abcam®) en suivant le protocole du fournisseur. Brièvement, les tissus sont homogénéisés dans le tampon de pré-extraction à un volume de 5 mL de tampon par gramme de tissus à l'aide d'un potter. Les homogénats sont laissés à incuber sur glace pendant 15min. Les tubes sont ensuite centrifugés à 12 000 g à 4°C pendant 10 min. Les surnageants sont enlevés et les culots repris dans le tampon d'extraction à un volume de 10 μ L pour 2 mg de tissus. Les tubes sont incubés 15 min sur glace avec un vortex de 5s toutes les 3min et sont ensuite centrifugés à 14 000 g à 4°C pendant 10 min. Enfin, les surnageant contenant les ex-

traits de protéines nucléaires sont récupérés dans des tubes Eppendorfs stériles et conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

4.3.2 *Dosage des protéines*

Les concentrations en protéines des extraits ont été mesurées par le biais du Qubit 4 (ThermoFisher Scientific) en suivant les instructions du fournisseur. Brièvement, les échantillons protéiques sont préalablement dilués au $10^{\text{ème}}$. Le tampon de dosage est préparé en prenant l'équivalent de $199\ \mu\text{L}$ de tampon et $1\ \mu\text{L}$ de fluorochrome pour chaque tube. De ce mélange, $199\ \mu\text{L}$ est prélevé dans lequel $1\ \mu\text{L}$ de l'extrait protéique dilué est ajouté. Les tubes sont incubés 15 min à température ambiante avant d'être homogénéisés et dosés. En moyenne, nous avons obtenu au final, $5,76\ \mu\text{g}/\mu\text{L} \pm 0,21$ dans environ $80\ \mu\text{L}$ pour l'amygdale, et $7,43\ \mu\text{g}/\mu\text{L} \pm 0,30$ dans environ $19\ \mu\text{L}$ pour le NAc.

4.3.3 *Mesure de l'activation de NFκB*

4.3.3.1 *Kit de type ELISA*

Tout d'abord, afin de mesurer l'activation du facteur de transcription dans les extraits nucléaires nous avons envisagé d'utiliser un kit dérivé d'un test ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) « ab133112 – NFκB p65 transcription factor assay kit » (abcam®). Ainsi, celui-ci permet par le biais d'oligonucléotides, contenant la séquence κB (l'élément de réponse de facteur de transcription) immobilisée au fond d'une plaque de 96 puits, la fixation des NFκB se trouvant dans une conformation « active » et capable de se fixer à l'ADN. L'utilisation d'un anticorps primaire spécifique puis secondaire conjugué à un HRP permettrait ainsi une mesure colorimétrique de la quantité de NFκB activé dans un échantillon donné. En revanche, malgré plusieurs essais avec des quantités de protéines différentes (**Figure MM11**) nous n'avons pas réussi à obtenir le moindre signal colorimétrique dans aucun des groupes.

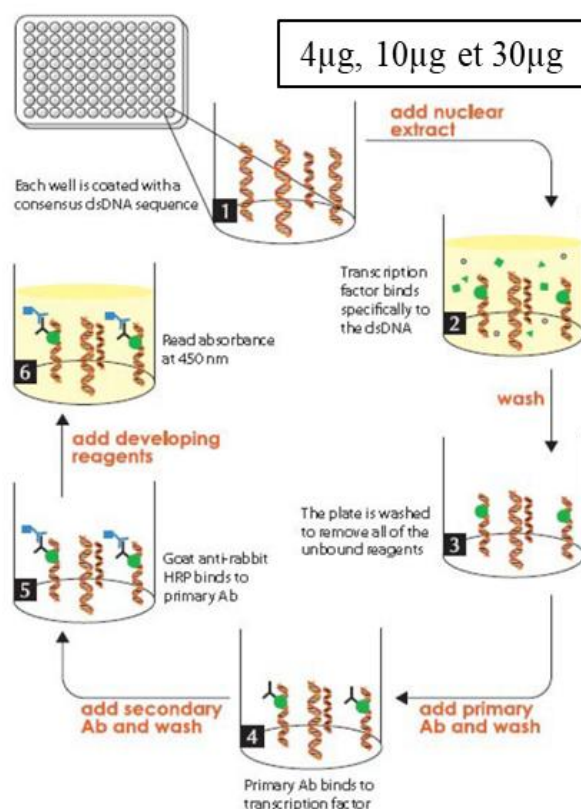


Figure MM11 : Principe du kit ab133112 (image adaptée du fournisseur)

4.3.3.2 Western blot

Préparation des échantillons protéiques. Les échantillons de protéines nucléaires extraites préalablement (voir 4.3.1) sont dilués à 2 µg/µL dans de l'eau ultra pure, ainsi que, dans le bleu de Laemmli (¼ du volume final) et β-mercaptoéthanol. Ceux-ci sont ensuite incubés pendant 10 min au bain marie à 70°C. Les échantillons sont ensuite conservés au -80°C jusqu'à utilisation.

Migration. Pour les tests : le gel de migration acrylamide 12% est préparé avec le « TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide kit 12% » (BioRad #161-0185) en suivant les instructions du fournisseur. Pour les expériences : nous avons utilisé des gels commerciaux 4-15% Criterion™ TGX Stain-Free™ Precast gels (Bio-Rad #567-8085). Le gel est ensuite placé dans le dispositif de migration immergé dans le tampon de migration 1X (Tris-base 60 g, glycine 288 g, SDS 20 g et eau déminéralisée 2 L pour un tampon 10X). L'échelle de taille (Precision Plus Protein™ All blue Standards, BioRad #161-0373) est déposée à 15 µL, ainsi que les échantillons à 15 µL (équivalent de 30 µg de protéines). La migration se déroule pendant 40 min à un voltage de 180 mV et environ 36 mA.

Transfert. Le transfert sur membrane de 0,2 µm PDVF est réalisé à l'aide du kit « Trans-Blot® Turbo™ Transfert System » (BioRad #1704156 ou #1704157) et d'un Trans-Blot® Turbo™

Transfert System (BioRad #1704150). A la fin du transfert, la membrane est immergée dans un bain d'éthanol 100% pendant 40s avant d'être immergée dans de l'eau déminéralisée.

Blocage des sites aspécifiques. Les sites aspécifiques sont bloqués en immergeant la membrane dans une solution d'I-BLOCK préalablement préparé : 200 mg Tropix® I-BLOCK™ (Applied Biosystem™) dans 100 mL de PBS-Tween 0,1%, pendant 1 h sous agitation horizontale à température ambiante.

Marquage. La membrane est incubée avec l'anticorps primaire (voir concentrations **Tableau MM3**) toute une nuit à 4°C sous agitation orbitale. Celle-ci est ensuite lavée 6 x 5 min dans du PBS-Tween0,1% à température ambiante sous agitation horizontale. La membrane est ensuite incubée dans l'anticorps secondaire (voir concentrations **Tableau MM3**) pendant 1 h à température ambiante sous agitation horizontale avant d'être lavée 3 x 5 min dans du PBS-Tween 0,1% puis 3 x 5 min dans de l'eau ultra pure.

Révélation. L'immunomarquage est révélé en incubant la membrane dans une solution ECL (« enhanced chemoluminescence », Clarity™ Western ECL Substrate, BioRad #170-5061) pendant 5min à l'obscurité et sous agitation orbitale. Le marquage est visualisé dans un système d'imagerie « ChemiDoc™ Touch Imaging System » (BioRad).

Quantification. La quantification est permise par l'utilisation du logiciel ImageLab (BioRad).

Stripping. Dans le cadre de nos expériences, des étapes de « stripping » ont été utilisées pour tester plusieurs anticorps sur les mêmes échantillons. Pour cela, les membranes sont incubées dans un tampon de stripping préalablement préparé (pour 1 L : 100 mL SDS20%, 125 mL TrisBase 0,5M pH=6,8, 775 mL eau milliQ et 8 mL β-mercaptoéthanol) et chauffé à 60°C pendant 45 min. Les membranes sont ensuite abondamment lavées à l'eau milliQ. Le Western blot peut ensuite recommencer à partir de l'étape « blocage des sites aspécifiques ».

	Cible	Espèce	Dilution	Référence
Anticorps primaires	Anti-NF-kappaB p65 (AcK310)	Lapin	1:2000	CPA3309
	Anti-NF-κB p65 (D14E12) XP®	Lapin	1:2000	sct 8242
	Anti-CTCF	Lapin	1:10000	millipore 07-729
Anticorps secondaire	Anti-Lapin IgG (H+L)-HRP Conjugate	Chèvre	1:4000	Bio-Rad 1706515

Tableau MM3 : Liste des anticorps utilisés pour les western blot

5 Analyses statistiques des résultats

Tous les résultats sont soit représentés individuellement pour les données d'un jour (histogramme) soit en moyenne \pm SEM pour les données d'évolution (courbe).

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel RStudio (1.1.463).

5.1 ANOVA à 2 facteurs

Le modèle d'analyse de variance (ANOVA) à deux facteurs est utilisé pour comparer un même résultat en fonction de deux variables pour plus de deux groupes d'individus indépendants. Ici, cette analyse est utilisée pour l'expérience 1 et permet de comparer le marquage p-NF κ Bp65 positive / mm² entre les différents groupes de traitement pour chaque structure séparément avec comme facteurs « cocaïne » et « temps de mise à mort ». Cette analyse est également utilisée pour l'expérience 5 et l'analyse des PCR et western blot avec comme facteurs « cocaïne » et « réactivation ».

5.2 ANOVA à mesures répétées

Le modèle d'ANOVA à mesures répétées permet une analyse de groupes pour lesquels un ou plusieurs facteurs sont répétés au sein d'un même groupe (within–subject variable) sans qu'il y ait de facteur intergroupe.

5.3 ANOVA mixte

Le modèle d'ANOVA mixte à deux facteurs permet une analyse de groupes pour lesquels un facteur est répété au sein d'un même groupe (within–subject variable) et l'autre différent entre les groupes (between-subject variable). Ce test est adapté pour une analyse d'effet de dose-réponse car il prend en compte les effets fixes et mixtes, c'est-à-dire les effets dû aux individus eux-mêmes qui correspondent donc à un facteur de variance explicable. Ainsi, il a été utilisé pour l'Article I expérience 2 et 3 avec comme « within-subject variable » les différentes doses de cocaïne et en « between-subject variable » les différents groupes de traitement. Une comparaison multiple a été faite quand cela était approprié avec une correction de la valeur p suivant la méthode Holm.

5.4 Modèle linéaire mixte

Le modèle linéaire mixte permet également une analyse de groupes pour lesquels un facteur est répété au sein d'un même groupe (within-subject variable) et un autre facteur est différent entre les groupes (between-subject variable) mais ici dans le cas où les valeurs sont de types linéaires. Celui-ci va modéliser une fonction linéaire de l'évolution (avant-après) et comparer les coefficients de ces courbes linéaires. Par ailleurs, ce modèle permet de prendre en compte les effets fixes et mixtes, c'est-à-dire les effets dû aux individus eux-mêmes qui correspondent donc à un facteur de variance explicable.

Ce modèle est donc utilisé dans l'expérience Article II expériences 1 et permet la comparaison des coefficients de réinstallation des différents groupes de traitement. Ce modèle est aussi utilisé pour vérifier l'homogénéité du comportement des différents groupes avant traitement.

5.5 Vérification des postulats d'analyses

Pour l'ensemble de ces analyses, la normalité a été vérifiée par l'utilisation du test Shapiro-Wilk et par visualisation QQplot. L'homogénéité des variances a été vérifiée par l'utilisation du test Bartlett ou Levene. Pour l'ANOVA mixte, l'homogénéité des covariances a été vérifiée par l'utilisation du test M de Box et la sphéricité a été automatiquement vérifiée, et corrigé, lors du test ANOVA par le test de Mauchy. Dans les cas où ces postulats n'étaient pas validés, des transformations Log ou BoxLox de la variable résultat ont été utilisées.

Résultats

Les résultats principaux de ce travail de thèse sont présentés sous forme de deux articles alors que les résultats supplémentaires sont présentés sous forme d'annexes à la suite de cette partie.

L'article I comporte les principaux résultats de la première partie de ce travail de thèse portant sur le rôle du NF κ B dans la consommation de cocaïne. L'article I est présenté sous sa forme finale soumis le 29 janvier 2021 à *Neuropharmacology*.

L'article II comporte les principaux résultats de la seconde partie de ce travail de thèse portant sur le rôle du NF κ B dans la mémoire liée aux indices associés à la cocaïne. Plusieurs expériences encore en cours et futures permettront de finaliser cet article. Pour cette raison, celui-ci est présenté sous forme de premier « draft » sans discussion. La discussion sera évidemment écrite en fonction des résultats futurs. Les éléments de discussion associés à ces premiers résultats sont présents dans la discussion générale.

Article I

Andrographolide, an NFκB inhibitor, increases voluntary cocaine intake and motivation for the drug in rats

Caroline Correia, Katia Befort[#] and Pascal Romieu^{#*}

Université de Strasbourg, Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives (LNCA), Centre de la Recherche Nationale Scientifique (CNRS), UMR 7364, 12 rue Goethe, F-67000, Strasbourg, France

Running title: Increase of Cocaine intake by NFκB inhibitor

Keywords

Addiction, Cocaine, Intravenous self-administration, NFκB

***Corresponding author:** Pascal Romieu,

LNCA

Université de Strasbourg Faculté de Psychologie,

12 rue Goethe, F-67000

Strasbourg, France

romieu@unistra.fr

Co-last authors

Abbreviation

AGL: andrographolide, DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole; DMS/DLS: dorsomedial/dorsolateral striatum, DMSO: dimethyl sulfoxide, DR: dose-response, FR: fixed ratio, IHF: immunohistofluorescence, ivSA: intravenous self-administration, NAc: nucleus accumbens, NFκB: nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells, aNP: active nose-poke, PR: progressive ratio, PrL: prelimbic cortex, TLR: toll-like receptor

Abstract

It is now well established that cocaine consumption induces many brain adaptations, which, at least partially, contribute to the development of addiction. In particular, exposure to cocaine increases several markers of neuroinflammation in different brain areas. However, the role of these regulations in cocaine consumption is still unclear. In this study, using cocaine intravenous self-administration (ivSA) in rats, we assessed the effect of long-term cocaine consumption on NF κ B, a central transcription factor involved in neuroinflammation. Using immunohistofluorescence, we measured, in different brain regions, the level of the phosphorylated form of NF κ Bp65 subunit on serine 536, a post-transductional modification strongly associated with NF κ B activation, after one-month of daily cocaine ivSA sessions. Then, we tested the influence of systemic administration of andrographolide (AGL), an inhibitor of NF κ B DNA binding, on cocaine self-administration. We show that cocaine consumption can increase levels of phosphorylated NF κ Bp65 in striatal regions and that AGL further increases both cocaine consumption and motivation for the drug. These results suggest that cocaine-induced NF κ B activation could be a mechanism involved in the limitation of cocaine consumption.

1. Introduction

Cocaine addiction is a worldwide health problem that affects millions of people and often represents a risk factor for numerous health conditions, including myocardial infarction and anxiety disorders (*Observatoire français des drogues et toxicomanies* OFDT, 2012). Cocaine use has risen considerably these last few years in both North America and Western Europe (World Drug Report, 2020). Cocaine intake leads to many neuroadaptations including long-term neuronal and molecular modifications that are thought to participate in substance use disorders (De Sa Nogueira et al., 2019; Korpi et al., 2015b).

Cocaine use has recently been associated with neuroinflammatory processes (Crews et al., 2011; Lacagnina et al., 2017). Indeed, several inflammatory and neuroinflammatory markers can be increased in different tissues following cocaine intake by humans, rats and monkeys (see reviews, Correia et al., 2020; Clark et al., 2013; Vallender et al., 2017). For instance, chronic cocaine use in humans has been coupled with increased serum levels of the proinflammatory interleukin IL6, and decreased levels of the anti-inflammatory interleukin IL10 (Moreira et al., 2016). Also enhanced microglia activation was observed in post-mortem brains of cocaine users (Little et al., 2009). Together, these findings support a global pro-inflammatory state following cocaine consumption. In this context, it is noteworthy that mice treated with cocaine display higher expression of the p65 subunit of NF κ B (nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells), a transcription factor known to be involved in

neuroinflammation (Lawrence, 2009), in the nucleus accumbens (NAc), a brain region critically implicated in cocaine's behavioral effects (Ang et al., 2001; Russo et al., 2009; R. Zhu et al., 2018). This NF κ B signaling regulation suggested a role of the transcription factor in long-term adaptations to cocaine. Blockade of NF κ B activation in mice via bilateral injection of a dominant negative construct reducing the canonical pathway to NF κ B activation, decreased cocaine conditioned place preference (Russo et al., 2009). Moreover, this transcription factor is a downstream element of the TLR pathways (Brown et al., 2011) thought to be directly activated by cocaine acting as a xenobiotic component and triggering neuroinflammatory responses (Hutchinson and Watkins, 2014; Northcutt et al., 2015). Finally, we have previously shown that cocaine intake in rats induced, in prefrontal cortex, differential DNA methylation in genomic regions of genes coding proteins interacting in a network centered around NF κ B (Fonteneau et al., 2017). However, the potential relationship between NF κ B and voluntary intake of cocaine remains uncharacterized.

Voluntary cocaine intake is modeled in rodents using the intravenous self-administration (ivSA) technique, whereby the drug is administered to the rat, through an indwelling catheter, contingently on the behavior of the animal (LeSage et al., 2002). Many schedules of reinforcement have been developed, among which low fixed-ratio (FR) ones measure drug consumption with low effort requirements, whereas others, such as progressive ratio (PR) schedules, are designed to assess motivation to obtain the reward (Hodos, 1961; Richardson and Roberts, 1996; Sanchis-Segura and Spanagel, 2006).

We first examined the effect of extended cocaine intake under an FR5 schedule of reinforcement on NF κ B activation in several reward-related brain areas, such as the NAc, the amygdala and the prefrontal cortex. For this purpose, we specifically targeted the phosphorylated form of the p65 subunit of NF κ B by immunohistofluorescence as this post-transductional modification is an important step in the development of its transcriptional activity. Then, to test the hypothesis that neuroinflammatory processes involving NF κ B were associated with voluntary cocaine intake and motivation, we evaluated the effects of administration of andrographolide (AGL), an anti-inflammatory drug known to inhibit the binding of NF κ B to DNA sequences (Jayakumar et al., 2013), on responding for cocaine under FR and PR schedules of reinforcement.

2. Methods

2.1. Animals

Ninety-nine Male Wistar rats (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France), weighing 150–174 g upon arrival, were housed in standard home cages (2 rats per cage), under a reversed 12h light/dark cycle

(lights on at 8:00 P.M.), with *ad libitum* access to food and water. After two weeks of habituation to facility and handling, rats were submitted to surgery for catheter implantation into the jugular vein. Behavioral experiments began after a 5–7 day recovery period and were always conducted during the dark period of the nycthemeral cycle. All procedures were in accordance with the European Union directive (2010/63/UE) and approved by the local ethics committee (Comité Régional d’Ethique en Matière d’Expérimentation Animale de Strasbourg, CREMEAS, APAFIS #7052 and #17797).

2.2. Pharmacological treatments

Cocaine hydrochloride was obtained from Cooper (#1164500, Melun, France) and dissolved in sterile saline solution (NaCl 0.9%) to achieve the required doses for self-administration (0.087, 0.175, 0.25, 0.33, 0.75 mg/kg/injection). AGL (Sigma Aldrich, #365645, St Louis, USA) was suspended in a saline solution of DMSO (1.5%). AGL or vehicle (DMSO 1.5%) was injected intraperitoneally (i.p.) at 2 mL/kg body weight.

2.3. Surgery

An intravenous catheterization procedure was performed as previously described (Romieu et al., 2008). Briefly, rats were anesthetized by a mixture of ketamine (90 mg/kg, i.p., Imalgene 1000, Merial) and xylazine (10 mg/kg, i.p., Rompun®, Bayer), then treated with meloxicam (1 mg/kg, s.c., Metacam®, Boehringer Ingelheim) and local lidocaine at the incision sites (1 mg/kg each, s.c., Lurocaïne, Vétoquinol). The silicone catheter (0.025” x 0.047” x 0.011”, 12 cm length, Phymep), fitted to a 23-gauge guide cannula mounted on the back of the rat, was inserted in the right jugular vein. Catheters were flushed daily throughout experiments with heparin solution (200µl, 100 U/ml, Héparine Choay®, Sanofi) to prevent catheter clotting.

2.4. Intravenous self-administration (ivSA)

See Figure 1 for behavioral details.

2.4.1. Apparatus

Intravenous self-administration (ivSA) was performed in dark operant chambers (20 x 20 x 30 cm) as previously described with slight modifications (de Sa Nogueira et al., 2020; Romieu et al., 2008). A single channel fluid swivel (Plastic Ones, Phymep) was mounted on a balanced arm above each chamber. A computer-driven syringe pump (Imetronic®) activated a 10 mL syringe and pushed fluid into SILASTIC® tubing (0.025”x 0.047”x 0.011”, Plastic Ones, Phymep) connected to the rat

through its externalized 23-gauge guide cannula. The chamber was equipped with two 2.5 cm diameter holes located 4 cm above the floor, allowing nose-poke (NP) behavior. One was defined as the active hole for delivering the fluid, while the other one was inactive. Active and inactive holes were counterbalanced between right and left positions within each group of rats. Disruption of an infrared photobeam in each hole was detected using a digital input card (DIO-24; National Instruments) and homemade LabView® software (National Instruments). NPs into both holes were recorded. NPs into the inactive hole had no programmed consequence. When the required number of NPs in active hole (aNP) was reached, a 63 μ L fluid volume was delivered in 2 sec through the iv catheter in co-occurrence with a 5 sec white flashing-light LED (1.5 Hz), located 12 cm above the active hole. This was followed by a white house-light LED illumination for 35 sec corresponding, altogether, to a total 40 sec time-out period.

2.4.2. Experiment 1. Assessment of phosphorylated p65 after one-month cocaine ivSA

Fixed ratio (FR) acquisition. An FR schedule of reinforcement was carried out during nine daily 2 h sessions. Each cocaine (0.33 mg/kg/injection) or NaCl 0.9% injection was earned after completion of five aNPs (FR5). Acquisition of cocaine ivSA was validated when rats self-administered cocaine at least 30 times during the 2 h session (Figure 2A) with a percentage of NPs in the active hole above 70 %.

Dose-Response (DR). While control rats still self-administer saline solution, cocaine ivSA rats were submitted to different doses of cocaine (0.087, 0.175, 0.25 and 0.75 mg/kg/injection) in a pseudo-Latin square manner. Each rat self-administered each cocaine dose for four consecutive 2 h daily sessions.

Intake stabilization. After completion of the DR protocol, all rats were submitted to a FR5 schedule of reinforcement at 0.33 mg/kg/injection for four 2 h daily sessions. Rats were then killed 2 h or 22 h after the end of the last ivSA session.

2.4.3. Experiment 2. Assessment of AGL effect on FR cocaine DR

After 6 sessions under an FR5 schedule of reinforcement at 0.33 mg/kg/injection (Figure 3A), rats were divided into 3 groups (AGL 0, 1 and 3 mg/kg, i.p.) and submitted to a DR protocol (0.087, 0.175 and 0.33 mg/kg/injection) in a pseudo-Latin square manner, each of which was tested for three consecutive daily sessions. AGL was administered 30 min before the starting of each ivSA session. The number of injections was counted, and the level of cocaine exposure (intake, in mg/kg/session) was calculated.

2.4.4. Experiment 3. Assessment of AGL effect on PR cocaine DR

Progressive ratio acquisition. Following FR acquisition, rats underwent daily PR schedule of reinforcement over four daily sessions using 0.33 mg/kg/injection. Under the PR schedule of reinforcement, the number of aNPs required for a single cocaine injection escalated within the session according to an exponential equation initially described by Richardson and Roberts (1996) ($aNPs = 5e^{0.2*n} - 5$, where n corresponds to the rank number of the injection). Each daily session lasted for 5h or until the animal did not achieve the cut-off criterion (i.e., any injection within 1 h).

AGL assessment on cocaine DR. After PR acquisition, rats were divided into two pharmacological conditions (AGL 0 and 3 mg/kg, i.p.) and were all submitted simultaneously to different successive cocaine doses (0.33, 0.75, 0.087 and 0.175 mg/kg/injection, in this order). Each dose was tested during three consecutive sessions. AGL was administered 30 min before the start of each ivSA session. The number of injections and aNPs were counted and breaking points (i.e., the highest number of aNPs made to obtain a single injection) were determined.

2.5. *Immunohistofluorescence (IHF)*

After 1 month of daily cocaine ivSA sessions under FR5 schedule of reinforcement, rats were anesthetized with pentobarbital (500mg/kg, i.p., Doléthal®, Vétquinol) 2 or 22 h after the last ivSA session. They were perfused, using a cannula inserted into the ascending aorta and connected to a peristaltic pump (10 mL / min), with 50 mL of phosphate buffered saline (PBS) solution followed by 100 mL of a paraformaldehyde (PFA) solution (4% w/v). Brains were extracted, post-fixed during 2h in PFA 4% and immersed for 48 h in an aqueous solution of sucrose 20 %. Brains were frozen in isopentane at -40°C and kept at -80°C until cryosection. Brains were cut in coronal slices (40 µm, Leica cryostat HM560) with a sampling of approximately 160 µm.

Free-floating brain sections were incubated for 1 h in a blocking solution (PBS containing 5% horse serum and 0.5% Triton X-100), then overnight at room temperature with a mouse primary antibody targeting the phosphorylated form of p65 (p-NFκBp65) on serine 536 (sc-136548, Santa Cruz, USA) diluted 1:1000 in PBS+0.5% Triton X-100. Sections were then incubated for 2 h at room temperature with Alexa fluor488-conjugated anti-mouse secondary antibody (R37114, Invitrogen) diluted at 1:1000 in PBS+0.5% Triton X-100. Sections were mounted using Mowiol® (Sigma Aldrich #81381) on gelatinized slides. All the images were acquired using a Nanozoomer (Nanozoomer S60, Hamamatsu photonics, INCI, Strasbourg, France) and analyzed at 20x objective (Sup. Figure 1A).

2.6. Counting

The number of p-NFκBp65 positive cells was automatically counted using the spot detector module of the ICY software (developed by Institut Pasteur, France) in brain regions of interest delimited using the NDPview2 software (#U12388-01 Hamamatsu). Within each coronal section (6-8 sections per region), regions of both hemispheres were analyzed and then averaged for each animal. The results were expressed as number of p-NFκBp65 positive cells per square millimeter.

2.7. Statistical analysis

All analyses were carried out using RStudio (1.1.463) software. All results are expressed as mean ± S.E.M or as individual dot histograms when possible. Two-way ANOVAs were used in experiment 1 to determine difference in IHF counting in separated brain sub-regions with “cocaine” and “time of death” as variables (between-subject factors). Two-way mixed ANOVAs were used in experiments 2 and 3 DR paradigms with “dose of cocaine” and “AGL treatment” as variables (within and between-subject factors) taking into account fixed and random effects. A repeated measures ANOVA was used in experiment 1 DR paradigm with “dose of cocaine” as a variable (within-subject factor). Linear mixed models (LMM) were used to check the pre-treatment groups’ homogeneity, adapted for linear featured data, with “future treatment group” and “sessions” as variables (within and between-subject factor) taking in account fixed and random effects. Normality was verified using Shapiro-Wilk and QQPlot. Homogeneity of variance was checked using Bartlett or Levene tests. Homogeneity of covariance was validated using Box’s M test. Sphericity was checked using Mauchly’s test and was automatically corrected by applying a correction estimate on degrees of freedom.

3. Results

3.1. NFκB immunostaining following prolonged cocaine intake

3.1.1. Intravenous cocaine self-administration

The first experiment (Figure 1) was designed to allow rats to consume cocaine (or saline) over an extended period and to examine the effect of this intake on NFκB activation. Rats were allowed to acquire and stabilize cocaine SA behavior (0.33 mg/kg/injection) for 10 daily 2 h sessions under an FR5 schedule of reinforcement. Figure 2A shows that the number of cocaine self-injections was relatively stable (LMM, session effect $t_{(223,31)} = 0.736$, $p = 0.4623$) along the sessions (mean injec-

tions/session = 89 ± 9) and was significantly higher than the number of saline self-injections in the control group (mean injections/session = 15 ± 4). Rats typically performed more than 89 ± 4 % of their NPs into the active hole during the last 4 days (S6-S10, not shown). Animals were then subjected to a cocaine DR protocol (in a Latin square design, see methods) under which each rat was tested for each dose for four successive sessions. Figure 2B depicts the number of cocaine injections during the last session of each dose and shows that rats displayed a classical inverted U-shape curve (repeated measures ANOVA, $F_{(2,27)} = 12.49$, $p < 0.001$). These results allowed us to choose the cocaine doses to be tested in our pharmacological experiments (see below), i.e. two doses (0.087 and 0.33 mg/kg/injection) flanking the apparent peak dose (0.175 mg/kg/injection). All rats were further subjected to four ivSA sessions at the same dose (0.33 mg/kg/injection) where they showed a number of cocaine infusions at 100 ± 7.03 , whereas the number of saline infusions for control animals was 13 ± 1.38 (Figure 2C). The difference between cocaine and saline infusions was significant across sessions (linear mixed model analysis, LMM, $t_{(87.35)} = 9.67$, $p < 0.001$). Overall, rats performed 30 daily ivSA sessions, during which they consumed a total of 775.44 ± 27.92 mg/kg cocaine. Rats from each group were semi-randomly divided into two subgroups to be killed at 2 h or 22 h after the end of the last session. Both cocaine subgroups consumed a similar amount of cocaine over the whole paradigm (2h: 751.85 ± 33.21 mg/kg vs 22h: 796.22 ± 44.33 mg/kg).

3.1.2. phospho-NFκBp65 subunit immunohistofluorescence

We quantified the immunostaining of p-NFκBp65, a post-translational modification essential for addressing NFκB to the nucleus, which would reflect the effect of voluntary chronic cocaine intake on NFκB activation. This analysis was conducted on brain slices from the animals described above sacrificed at the two time points. Several brain reward-related regions were analyzed, in particular dopaminergic areas, including subdivisions of the medial prefrontal cortex (anterior cingulate, pre- and infralimbic cortices), orbitofrontal cortex, insular cortex, dorsal striatum, nucleus accumbens (NAc) and amygdala (Figure 2 and Sup Fig1). Immunostaining of p-NFκBp65 clearly consisted of punctiform fluorescent signals similar to those revealed by the nuclear marker DAPI (Sup Fig 1), strongly suggesting a nuclear location. We observed an increased staining in striatal regions of cocaine self-administering rats compared to controls. A two-way ANOVA analysis revealed a tendency for a cocaine x time interaction in NAc core ($F_{(1,20)} = 3.17$, $p = 0.090$) and shell ($F_{(1,20)} = 3.29$, $p = 0.085$). When simple effects were analyzed without the interaction term, a significant cocaine effect was obtained in both NAc core ($F_{(1,21)} = 4.49$, $p = 0.046$) and shell ($F_{(1,21)} = 6.54$, $p = 0.018$) (Figure 2D and 2E). This effect could be explained by a higher number of positive cells in rats killed 22 h

after the last cocaine ivSA session (824 ± 37.84 positives cells / mm^2 in NAc shell and 619.1 ± 43.1 in NAc core) in comparison to control rats (394.94 ± 56.38 positives cells / mm^2 in NAc shell and 539.42 ± 61.15 in NAc core). Statistical analysis also revealed a trend to significance between cocaine and saline self-administering rats in the dorsomedial striatum (DMS, $F_{(1,21)} = 3.57$, $p = 0.073$) whereas no difference was detected in the dorsolateral striatum (DLS, $F_{(1,21)} = 1.18$, $p = 0.288$) (Figure 2D and 2F). No significant differences were noted between behavioral conditions in the other examined regions including the cortical subregions or the amygdala (see Sup. Fig 1B, 1C and 1D). Pearson's correlation analysis revealed no significant relationship between neither the staining data and cocaine injections nor total cocaine intake (data not shown). Overall, our results strongly suggest that one month of daily voluntary cocaine intake induced NF κ B activation (phosphorylation and nucleus addressing), specifically in striatal regions.

3.2. Effect of AGL on cocaine ivSA

To evaluate the potential influence of NF κ B activity on cocaine ivSA behavior in rats, we measured the effect of AGL, a potent inhibitor of NF κ B activity, systemically administered 30 min before each ivSA session, under FR or PR schedules of reinforcement (*Experiments 2 and 3*, Figure 1).

For cocaine intake under FR5 (*Experiment 2*), we first trained rats to self-administer cocaine (0.33 mg/kg/injection). After acquisition of a stable cocaine ivSA behavior, animals were divided into three groups (vehicle, AGL 1 and AGL 3 mg/kg). These treatment groups displayed similar cocaine intake, as no statistical difference between groups across sessions was detected (LMM, Vehicle vs AGL 1 mg/kg, $t_{(219,10)} = -1.42$, $p = 0.157$; Vehicle vs AGL 3 mg/kg, $t_{(219,11)} = 0.23$, $p = 0.816$; Figure 3A). To characterize the potential effect of AGL, rats were submitted to several doses of cocaine, following a Latin-square design. The number of self-injections and cocaine intake during the 3rd session of each dose are depicted in Figures 3B and 3C, respectively. A two-way mixed ANOVA revealed a significant treatment x cocaine dose interaction on the number of injections ($F_{(4,82)} = 5.88$, $p = 0.0003$) and total cocaine intake (mg/kg/session) ($F_{(2,57,52,59)} = 2.94$, $p = 0.049$). A significant effect of the cocaine dose was also observed on the number of injections ($F_{(2,82)} = 17.46$, $p < 0.001$) and total intake ($F_{(1,28,52,59)} = 140.52$, $p < 0.001$). In addition, a simple effect of treatment was obtained at the 0.087 mg/kg/injection dose ($F_{(2,41)} = 7.61$, $p = 0.006$) for both the number of injections and total intake. Pairwise t-tests adjusted with Holm method indicated a significant greater number of cocaine self-administration infusions, at the lowest dose of cocaine in AGL 3 mg/kg-treated rats (116 ± 12 self-injections) in comparison to AGL 1 mg/kg (60 ± 8 injections; $p = 0.0012$) and to vehicle (80 ± 10 injections, $p = 0.039$) treated rats (Figure 3B). Not surprisingly, the same was observed for total

cocaine intake at the lowest dose, reaching 10.06 ± 1.02 mg/kg in AGL 3 mg/kg-treated rats whereas AGL 1 mg/kg and vehicle-treated rats were self-exposed to 5.26 ± 0.71 and 6.98 ± 0.91 mg/kg, respectively (Figure 3C). No statistical difference was reached for the comparison of AGL 1 mg/kg and vehicle-treated rats ($p = 0.181$). This result indicates that AGL, at least at 3 mg/kg in our experimental conditions, was able to modulate cocaine ivSA behavior for the low dose of cocaine, suggesting that NF κ B inhibitor increased the reinforcing properties of the drug.

In the last experiment, we assessed the impact of AGL administration on motivation of rats for cocaine, using a PR schedule of reinforcement (*Experiment 3*). Rats were initially submitted to a cocaine (0.33 mg/kg/injection) ivSA behavioral acquisition procedure under FR5, then to PR schedules of reinforcement for four daily sessions. Two homogeneous groups of rats (vehicle and AGL treatment) were then constituted (Figure 4A). Analysis showed that behavioral response was stable across groups before the treatment (LMM, $t_{(30)}=0.37$, $p = 0.711$). An AGL (3 mg/kg) effect was assessed in rats submitted to different successive cocaine doses for three daily consecutive sessions. Number of self-injections (Figure 4B), aNPs (Figure 4C) and value of the breaking point (Figure 4D) reached by vehicle- and AGL-treated rats are presented for the 3rd session of each cocaine dose. A two-way mixed ANOVA revealed a significant simple main effect of the cocaine dose on the number of injections ($F_{(3,33)} = 69.20$, $p < 0.001$), number of aNPs ($F_{(1.41,15.47)} = 71.95$, $p < 0.001$) and breaking point ($F_{(1.69,18.64)} = 79.24$, $p < 0.001$). Cocaine seeking behavior increased in all groups with increasing cocaine doses. In addition, a significant treatment x cocaine interaction was found between groups on the number of aNPs ($F_{(1.41,15.47)} = 5.88$, $p = 0.02$), as well as on breaking points ($F_{(1.69,18.64)} = 4.74$, $p = 0.026$). No significant interaction (treatment x cocaine dose) was found on the injection numbers ($F_{(3,33)} = 1.209$, $p = 0.322$), probably explained by the low number of injections on a PR schedule of reinforcement (Figure 4B). Pairwise t-test adjusted with Holm method revealed that AGL-treated rats displayed a significantly increased responding compared to control rats, in terms of aNPs ($p = 0.037$, Figure 4C) and level of breaking point ($p = 0.04$, Figure 4D), only at the highest dose of cocaine. Overall, these results indicated that the NF κ B inhibitor increased motivation of rats for cocaine, at least when rats self-administered a high dose of the drug.

4. Discussion

Overall, the current study supports the involvement of NF κ B in the regulation of cocaine consumption in rats. We demonstrated that chronic voluntary cocaine intake increases NF κ B activation in rat striatal regions. Moreover, systemic administration of AGL, a pharmacological inhibitor of NF κ B,

increases both reinforcing properties of cocaine under an FR5 schedule of reinforcement and motivation for the drug under a PR schedule of reinforcement.

4.1. Chronic cocaine intake increases NF κ B activation

We found that the phosphorylated form of p65 subunit of NF κ B on serine 536, associated with NF κ B activation and translocation from cytosol to nucleus (Huang et al., 2010), was increased in the NAc after one-month of intravenous cocaine infusions. This result is in line with previous work showing that NF κ B activation is increased in the NAc of rodents treated by passive cocaine injections (Russo et al., 2009; Zhu et al., 2018). Several cellular mechanisms could be responsible for this effect. One could result from the potentiation of dopamine neurotransmission by the drug (Di Chiara and Imperato, 1988; Ritz et al., 1987) and the potential overactivation of dopamine receptors. Indeed, several studies performed on cell cultures have demonstrated NF κ B activation following dopamine D1 (Han et al., 2007; Lepsch et al., 2009) or D2 receptor (Takeuchi and Fukunaga, 2003; Xie et al., 2007) stimulation. For instance, PC12 cells incubated with cocaine displayed an increase in NF κ B transcriptional activity 3 to 8 hours later in a D1R-dependent manner (Lepsch et al., 2009). In renal proximal tubule cells, dopamine acted on D1Rs to increase extracellular calcium uptake, notably through increased levels of p-NF κ Bp65 (Han et al., 2007). Moreover, in NG108-15 cells expressing a luciferase reporter gene under the control of NF κ B, D2R increased NF κ B transcriptional activity through activation of the ERK pathway (Takeuchi and Fukunaga, 2003). However, in this latter study, pharmacological activation of D1R displayed the opposite effect, highlighting the diversity of potential effects depending on the cell line. Overall, cocaine-induction of striatal NF κ B activation could be a consequence of increased dopamine neurotransmission in the NAc. Interestingly, other systems could mediate effect of cocaine on p-NF κ Bp65. Indeed, *in silico* and *in vitro* study has shown a direct binding of cocaine to MD2/TLR4 and proposed that this interaction in the ventral tegmental area could participate to cocaine-induced dopamine release in the NAc (Northcutt et al. 2015). Yet, TLR4 is one of the most potent trigger of the canonical pathway activating NF κ B (Verstrepen et al., 2008). Although not yet demonstrated, a similar mechanism could be proposed in the NAc. Moreover, a recent report showed that TLR3 blockade in the NAc or TLR3 deficiency was sufficient to prevent cocaine-induced increase of phosphorylation of NF κ Bp65 (R. Zhu et al., 2018). In any case, the authors proposed a role for central pro-inflammatory immune signaling in drug reward, probably through dysregulation of lncRNAs in NAc (Bu et al., 2012). As NF κ B is one of the main downstream factors of TLRs, it is possible that cocaine induces NF κ B activation through this pathway by either direct (i.e., TLR4) or indirect (i.e., TLR3) interactions.

4.2 Cocaine intake is modulated by an NFκB inhibitor

We examined the effect of AGL on consumption of, and motivation for, cocaine. AGL is a labdane diterpenoid lactone able to cross the blood-brain barrier (Bera et al., 2014) and known to produce anti-inflammatory effects (Tan et al., 2017), notably through direct inhibitory action of NFκB activation. AGL prevented NFκB DNA binding by forming a covalent adduct with a cysteine residue of the p50 subunit of NFκB, disrupting the interaction of the dimers (for instance p50/p65) with nuclear proteins (Xia et al., 2004). It can also recruit protein phosphatase 2A to dephosphorylate NFκBp65 at S536, hence inhibiting LPS-induced transcriptional activity of NFκB (Hsieh et al., 2011). Finally, AGL was demonstrated to inhibit NFκBp50 and p65 nuclear translocation (Bao et al., 2009; Hsieh et al., 2011), and activation (Chen et al., 2014). Using several doses of cocaine in an FR5 schedule of reinforcement, we showed that systemic AGL administration increased cocaine consumption behaviors, a shift of the cocaine ivSA DR curve to the left being the most probable effect. This result suggests an increase in the reinforcing properties of the drug. This was not observed across the whole range of cocaine doses, ruling out a nonspecific effect such as potential hyperlocomotion. Dose-dependent alterations of cocaine ivSA under an FR schedule of reinforcement has been described in experiments targeting D2R, for which levels in the striatum and midbrain have been inversely correlated with vulnerability to addiction (Bello et al., 2011; Volkow et al., 2002). In addition, Chen and coworkers (2018) showed that knockdown of D2R in the NAc increased cocaine ivSA in rats only in the low range of cocaine doses (0.02 – 0.07 mg/kg/injection, iv). Interestingly, knock-out mice for gene encoding the NFκBp50 subunit displayed lower levels of striatal D2R in comparison to wild-type mice, implying that NFκB transcriptional activity is necessary for normal levels of striatal D2R (Xie et al., 2007). Altogether, this suggests that low D2R level could result in lower NFκB activation. Inhibiting NFκB activity with AGL may result in hypofunction of D2Rs in the NAc, hence increasing intake, at low doses of cocaine. Further experiments beyond the scope of our study should investigate the effect of AGL treatment on D2R expression in the NAc.

Under a PR schedule of reinforcement, AGL increased the level of breaking point, suggesting a higher motivation of rats for cocaine. This effect was observed only at the high dose of cocaine. Cocaine increases extracellular dopamine concentration in the NAc in a dose-dependent manner (for instance, Moghaddam and Bunney, 1989). Interestingly, blocking TLR4 by (+)-naltrexone further increases cocaine-induced dopamine accumulation into the NAc, and only for the highest dose of cocaine (i.e., 1 mg/kg i.v.) (Tanda et al., 2016). Therefore, given the major importance of dopamine in motivation of rats for cocaine under PR (Depoortere et al., 1993), we can hypothesize that poten-

tial inhibition, by AGL, of TLR4-induced activation of NF κ B could potentiate dopamine release in the NAc following cocaine high dose infusions.

At first sight, our behavioral results seem discordant with previous studies examining NF κ B influence on cocaine effects. Russo and coworkers (2009) showed that intra-NAc inhibition of the canonical pathway leading to NF κ B activation, through viral-mediated gene transfer of a constitutively active dominant-negative mutant of IKK, prevented cocaine conditioned place preference (CPP). However, the CPP procedure is largely based on Pavlovian learning and memory mechanisms, in contrast to ivSA procedures that are mainly based on instrumental learning. Noteworthy, NF κ B has been consistently implicated in consolidation and reconsolidation processes of memory (de la Fuente et al., 2011, 2014; Freudenthal et al., 2005; Yang et al., 2011; Correia et al., 2020). Hence, in Russo and coworkers' study, the observed reduction in CPP could result from a weaker process of memory formation. In the same vein, Zhu and collab. (2018) showed that TLR3 inhibition reduced cocaine ivSA behavior in mice. However, it must be noticed that the cocaine dose used was relatively high (0.75 mg/kg/injection): in this case, a significantly reduced SA behavior could also result from a higher sensitivity of animals to the reinforcing properties of the drug revealed by a shift of the dose-response curve to the left.

4.3 NF κ B activation controls cocaine consumption

Altogether, based on our results, we hypothesize that cocaine-induced NF κ B activation in striatal regions could act as a homeostatic regulator against behavioral or cellular effects of cocaine administration. It has been described that NF κ B activation can both favor apoptosis or prevent cell death (Dresselhaus and Meffert, 2019; Mattson, 2005; Kassed et al., 2002; Su et al., 2015; Yu et al., 1999). In cell culture, cocaine induces apoptosis and activates NF κ B, which counteracted the cell death process (Lepsch et al., 2009). Hence, the hypothesis that cocaine-induced NF κ B activation could represent a protective mechanism against cell damage induced by cocaine could also apply *in vivo* (Russo et al., 2009).

Another homeostatic mechanism that could be involved in this NF κ B pathway includes autophagy, a process essential for plasticity, learning and memory (Shehata and Inokuchi, 2014), mostly through dendritic spine density regulation. Acute administration of cocaine in mice triggered the activation of the D1R-CaMKII-AMPK-FoxO3a signaling pathway recruitment in the NAc, and the development of autophagy (Lu et al., 2020). Inhibition of autophagy increases acute cocaine-induced locomotion and dendritic spine density, whereas its stimulation by rapamycin attenuated them (Lu et al., 2020). In this context, autophagy was proposed to restrain dendritic spine proliferation following cocaine

exposure, resulting in less pronounced effects of the drug. Such mechanisms could involve NF κ B, as autophagy and NF κ B signaling pathways display several cross-talks (Pawlowska et al., 2018). In sum, we can speculate that in response to cocaine exposure the stimulation of dopamine and/or Toll-like receptors activates NF κ B signaling, would eventually promote pro-learning processes, involving autophagy modulation and the development of dendritic spines necessary for accumbal plasticity involved in rewarded Pavlovian learning, as well as leading to a homeostatic compensatory process restraining cocaine intake.

5. Conclusion

Altogether, our study shows that prolonged voluntary cocaine intake induces NF κ B activation in striatal regions, a process that could be involved in limiting cocaine intake and homeostatic regulation of cocaine's toxic effects. Although anti-inflammatory therapeutic strategies against substance use disorder appear attractive, strategies involving NF κ B inhibitors should be undertaken with caution. Indeed, the timing and duration of treatment would be critical to avoid dual effects of acting on NF κ B signaling.

Aknowledgements

This work was supported by the Université de Strasbourg, the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). CC was supported by a PhD fellowship from the Ministère de la Recherche. The authors thank Dr MC. Olmstead and Dr R. Bourdy for discussions and critical reading of the manuscript. We thank Dr D. Massotte for advice in the Hamamatsu Nanozoomer use (INCI, Strasbourg), as well as C. Bimboes and V. Gabriel for technical support in immunohistofluorescence.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Ang, E., Chen, J., Zagouras, P., Magna, H., Holland, J., Schaeffer, E., Nestler, E.J., 2001. Induction of nuclear factor- κ B in nucleus accumbens by chronic cocaine administration. *J. Neurochem.* 79, 221–224.
- Bao, Z., Guan, S., Cheng, C., Wu, S., Wong, S.H., Kemeny, D.M., Leung, B.P., Wong, W.S.F., 2009. A novel anti-inflammatory role for andrographolide in asthma via inhibition of the nuclear factor- κ B pathway. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 179, 657–665. <https://doi.org/10.1164/rccm.200809-1516OC>
- Bello, E.P., Mateo, Y., Gelman, D.M., Noaín, D., Shin, J.H., Low, M.J., Alvarez, V.A., Lovinger, D.M., Rubinstein, M., 2011. Cocaine supersensitivity and enhanced motivation for reward in mice lacking dopamine D2 autoreceptors. *Nat. Neurosci.* 14, 1033–1038. <https://doi.org/10.1038/nn.2862>
- Bera, R., Ahmed, S.K.M., Sarkar, L., Sen, T., Karmakar, S., 2014. Pharmacokinetic analysis and tissue distribution of andrographolide in rat by a validated LC-MS/MS method. *Pharm. Biol.* 52, 321–329. <https://doi.org/10.3109/13880209.2013.836544>
- Brown, J., Wang, H., Hajishengallis, G.N., Martin, M., 2011. TLR-signaling networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk. *J. Dent. Res.* 90, 417–427. <https://doi.org/10.1177/0022034510381264>
- Brown, K.T., Levis, S.C., O'Neill, C.E., Northcutt, A.L., Fabisiak, T.J., Watkins, L.R., Bachtell, R.K., 2018. Innate immune signaling in the ventral tegmental area contributes to drug-primed reinstatement of cocaine seeking. *Brain. Behav. Immun.* 67, 130–138. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.08.012>
- Bu, Q., Hu, Z., Chen, F., Zhu, R., Deng, Y., Shao, X., Li, Y., Zhao, J., Li, H., Zhang, B., Lv, L., Yan, G., Zhao, Y., Cen, X., 2012. Transcriptome analysis of long non-coding RNAs of the nucleus accumbens in cocaine-conditioned mice. *J. Neurochem.* 123, 790–799. <https://doi.org/10.1111/jnc.12006>
- Chen, R., McIntosh, S., Hemby, S.E., Sun, H., Sexton, T., Martin, T.J., Childers, S.R., 2018. High and low doses of cocaine intake are differentially regulated by dopamine D2 receptors in the ventral tegmental area and the nucleus accumbens. *Neurosci. Lett.* 671, 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.02.026>
- Chen, Y.-Y., Hsu, M.-J., Hsieh, C.-Y., Lee, L.-W., Chen, Z.-C., Sheu, J.-R., 2014. Andrographolide inhibits nuclear factor- κ B activation through JNK-Akt-p65 signaling cascade in tumor necrosis factor- α -stimulated vascular smooth muscle cells. *ScientificWorldJournal* 2014, 130381. <https://doi.org/10.1155/2014/130381>
- Clark, K.H., Wiley, C.A., Bradberry, C.W., 2013. Psychostimulant abuse and neuroinflammation: emerging evidence of their interconnection. *Neurotox. Res.* 23, 174–188. <https://doi.org/10.1007/s12640-012-9334-7>
- Correia, C., Romieu, P., Olmstead, M.C., Befort, K., 2020. Can cocaine-induced neuroinflammation explain maladaptive cocaine-associated memories? *Neurosci. Biobehav. Rev.* 111, 69–83. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.01.001>
- Crews, F.T., Zou, J., Qin, L., 2011. Induction of innate immune genes in brain create the neurobiology of addiction. *Brain. Behav. Immun.* 25 Suppl 1, S4–S12. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.03.003>
- de la Fuente, V., Federman, N., Fustiñana, M.S., Zalzman, G., Romano, A., 2014. Calcineurin phosphatase as a negative regulator of fear memory in hippocampus: control on nuclear factor- κ B signaling in consolidation and reconsolidation. *Hippocampus* 24, 1549–1561. <https://doi.org/10.1002/hipo.22334>
- de la Fuente, V., Freudenthal, R., Romano, A., 2011. Reconsolidation or extinction: transcription factor switch in the determination of memory course after retrieval. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 5562–5573. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6066-10.2011>
- de Sa Nogueira, D., Bourdy, R., Filliol, D., Quessada, C., McCort-Tranchepain, I., Acher, F., Zwiller, J., Romieu, P., Befort, K., 2020. LSP2-9166, an orthosteric mGlu4 and mGlu7 receptor agonist, reduces cocaine self-administration under a progressive ratio schedule in rats. *Neurosci. Lett.* 135603. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.135603>
- De Sa Nogueira, D., Merienne, K., Befort, K., 2019. Neuroepigenetics and addictive behaviors: Where do we stand? *Neurosci. Biobehav. Rev.* 106, 58–72. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.08.018>
- Depoortere, R.Y., Li, D.H., Lane, J.D., Emmett-Oglesby, M.W., 1993. Parameters of self-administration of cocaine in rats under a progressive-ratio schedule. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 45, 539–548. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(93\)90503-1](https://doi.org/10.1016/0091-3057(93)90503-1)
- 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.14.5274>
- Dresselhaus, E.C., Meffert, M.K., 2019. Cellular Specificity of NF- κ B Function in the Nervous System. *Front. Immunol.* 10, 1043. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01043>

- Fonteneau, M., Filliol, D., Anglard, P., Befort, K., Romieu, P., Zwiller, J., 2017. Inhibition of DNA methyltransferases regulates cocaine self-administration by rats: a genome-wide DNA methylation study. *Genes Brain Behav.* 16, 313–327. <https://doi.org/10.1111/gbb.12354>
- Freudenthal, R., Boccia, M.M., Acosta, G.B., Blake, M.G., Merlo, E., Baratti, C.M., Romano, A., 2005. NF-kappaB transcription factor is required for inhibitory avoidance long-term memory in mice. *Eur. J. Neurosci.* 21, 2845–2852. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04126.x>
- Han, J.Y., Heo, J.S., Lee, Y.J., Lee, J.H., Taub, M., Han, H.J., 2007. Dopamine stimulates 45Ca^{2+} uptake through cAMP, PLC/PKC, and MAPKs in renal proximal tubule cells. *J. Cell. Physiol.* 211, 486–494. <https://doi.org/10.1002/jcp.20956>
- Hodos, W., 1961. Progressive ratio as a measure of reward strength. *Science* 134, 943–944. <https://doi.org/10.1126/science.134.3483.943>
- Hsieh, C.Y., Hsu, M.J., Hsiao, G., Wang, Y.H., Huang, C.W., Chen, S.W., Jayakumar, T., Chiu, P.T., Chiu, Y.H., Sheu, J.R., 2011. Andrographolide enhances nuclear factor-kappaB subunit p65 Ser536 dephosphorylation through activation of protein phosphatase 2A in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 286, 5942–5955. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.123968>
- Huang, B., Yang, X.-D., Lamb, A., Chen, L.-F., 2010. Posttranslational modifications of NF-kappaB: another layer of regulation for NF-kappaB signaling pathway. *Cell. Signal.* 22, 1282–1290. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.03.017>
- Hutchinson, M.R., Watkins, L.R., 2014. Why is neuroimmunopharmacology crucial for the future of addiction research? *Neuropharmacology* 76 Pt B, 218–227. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.05.039>
- Jayakumar, T., Hsieh, C.-Y., Lee, J.-J., Sheu, J.-R., 2013. Experimental and Clinical Pharmacology of *Andrographis paniculata* and Its Major Bioactive Phytoconstituent Andrographolide. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM* 2013, 846740. <https://doi.org/10.1155/2013/846740>
- Kassed, C.A., Willing, A.E., Garbuzova-Davis, S., Sanberg, P.R., Pennypacker, K.R., 2002. Lack of NF-kappaB p50 exacerbates degeneration of hippocampal neurons after chemical exposure and impairs learning. *Exp. Neurol.* 176, 277–288. <https://doi.org/10.1006/exnr.2002.7967>
- Korpi, E.R., den Hollander, B., Farooq, U., Vashchinkina, E., Rajkumar, R., Nutt, D.J., Hyytiä, P., Dawe, G.S., 2015. Mechanisms of Action and Persistent Neuroplasticity by Drugs of Abuse. *Pharmacol. Rev.* 67, 872–1004. <https://doi.org/10.1124/pr.115.010967>
- Lacagnina, M.J., Rivera, P.D., Bilbo, S.D., 2017. Glial and Neuroimmune Mechanisms as Critical Modulators of Drug Use and Abuse. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 42, 156–177. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.121>
- Lawrence, T., 2009. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a001651. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001651>
- Lepsch, L.B., Munhoz, C.D., Kawamoto, E.M., Yshii, L.M., Lima, L.S., Curi-Boaventura, M.F., Salgado, T.M.L., Curi, R., Planeta, C.S., Scavone, C., 2009. Cocaine induces cell death and activates the transcription nuclear factor kappa-B in PC12 cells. *Mol. Brain* 2, 3. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-2-3>
- LeSage, M.G., Keyler, D.E., Shoeman, D., Raphael, D., Collins, G., Pentel, P.R., 2002. Continuous nicotine infusion reduces nicotine self-administration in rats with 23-h/day access to nicotine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 72, 279–289. [https://doi.org/10.1016/s0091-3057\(01\)00775-4](https://doi.org/10.1016/s0091-3057(01)00775-4)
- Little, K.Y., Ramssen, E., Welchko, R., Volberg, V., Roland, C.J., Cassin, B., 2009. Decreased brain dopamine cell numbers in human cocaine users. *Psychiatry Res.* 168, 173–180. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2008.10.034>
- Lu, H.-F., Xiao, W., Deng, S.-L., Cheng, X.-L., Zheng, H.-L., Chen, J.-G., Wang, F., 2020. Activation of AMPK-dependent autophagy in the nucleus accumbens opposes cocaine-induced behaviors of mice. *Addict. Biol.* 25, e12736. <https://doi.org/10.1111/adb.12736>
- Mattson, M.P., 2005. NF-kappaB in the survival and plasticity of neurons. *Neurochem. Res.* 30, 883–893. <https://doi.org/10.1007/s11064-005-6961-x>
- Moghaddam, B., Bunney, B.S., 1989. Differential effect of cocaine on extracellular dopamine levels in rat medial prefrontal cortex and nucleus accumbens: comparison to amphetamine. *Synap. N. Y. N* 4, 156–161. <https://doi.org/10.1002/syn.890040209>
- Moreira, F.P., Medeiros, J.R.C., Lhullier, A.C., Souza, L.D. de M., Jansen, K., Portela, L.V., Lara, D.R., da Silva, R.A., Wiener, C.D., Oses, J.P., 2016. Cocaine abuse and effects in the serum levels of cytokines IL-6 and IL-10. *Drug Alcohol Depend.* 158, 181–185. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2015.11.024>

- Northcutt, A.L., Hutchinson, M.R., Wang, X., Baratta, M.V., Hiranita, T., Cochran, T.A., Pomrenze, M.B., Galer, E.L., Kopajtic, T.A., Li, C.M., Amat, J., Larson, G., Cooper, D.C., Huang, Y., O'Neill, C.E., Yin, H., Zahniser, N.R., Katz, J.L., Rice, K.C., Maier, S.F., Bachtell, R.K., Watkins, L.R., 2015. DAT isn't all that: cocaine reward and reinforcement require Toll-like receptor 4 signaling. *Mol. Psychiatry* 20, 1525–1537. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.177>
- OFDT (Observatoire Français des Drogues et des Toxicomanies), 2012. POUSSET M
- Pawlowska, E., Szczepanska, J., Wisniewski, K., Tokarz, P., Jaskólski, D.J., Blasiak, J., 2018. NF- κ B-Mediated Inflammation in the Pathogenesis of Intracranial Aneurysm and Subarachnoid Hemorrhage. Does Autophagy Play a Role? *Int. J. Mol. Sci.* 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19041245>
- Richardson, N.R., Roberts, D.C., 1996. Progressive ratio schedules in drug self-administration studies in rats: a method to evaluate reinforcing efficacy. *J. Neurosci. Methods* 66, 1–11. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(95\)00153-0](https://doi.org/10.1016/0165-0270(95)00153-0)
- Ritz, M.C., Lamb, R.J., Goldberg, S.R., Kuhar, M.J., 1987. Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine. *Science* 237, 1219–1223. <https://doi.org/10.1126/science.2820058>
- Romieu, P., Host, L., Gobaille, S., Sandner, G., Aunis, D., Zwiller, J., 2008. Histone deacetylase inhibitors decrease cocaine but not sucrose self-administration in rats. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 9342–9348. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0379-08.2008>
- Russo, S.J., Wilkinson, M.B., Mazei-Robison, M.S., Dietz, D.M., Maze, I., Krishnan, V., Renthal, W., Graham, A., Birnbaum, S.G., Green, T.A., Robison, B., Lesselyong, A., Perrotti, L.I., Bolaños, C.A., Kumar, A., Clark, M.S., Neumaier, J.F., Neve, R.L., Bhakar, A.L., Barker, P.A., Nestler, E.J., 2009. Nuclear factor kappa B signaling regulates neuronal morphology and cocaine reward. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 3529–3537. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6173-08.2009>
- Sanchis-Segura, C., Spanagel, R., 2006. Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. *Addict. Biol.* 11, 2–38. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2006.00012.x>
- Shehata, M., Inokuchi, K., 2014. Does autophagy work in synaptic plasticity and memory? *Rev. Neurosci.* 25, 543–557. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2014-0002>
- Su, Y., Qu, Y., Zhao, F., Li, H., Mu, D., Li, X., 2015. Regulation of autophagy by the nuclear factor κ B signaling pathway in the hippocampus of rats with sepsis. *J. Neuroinflammation* 12, 116. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0336-2>
- Takeuchi, Y., Fukunaga, K., 2003. Differential regulation of NF-kappaB, SRE and CRE by dopamine D1 and D2 receptors in transfected NG108-15 cells. *J. Neurochem.* 85, 729–739. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01711.x>
- Tan, W.S.D., Liao, W., Zhou, S., Wong, W.S.F., 2017. Is there a future for andrographolide to be an anti-inflammatory drug? Deciphering its major mechanisms of action. *Biochem. Pharmacol.* 139, 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.03.024>
- Tanda, G., Mereu, M., Hiranita, T., Quarterman, J.C., Coggiano, M., Katz, J.L., 2016. Lack of Specific Involvement of (+)-Naloxone and (+)-Naltrexone on the Reinforcing and Neurochemical Effects of Cocaine and Opioids. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 41, 2772–2781. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.91>
- Vallender, E.J., Goswami, D.B., Shinday, N.M., Westmoreland, S.V., Yao, W.-D., Rowlett, J.K., 2017. Transcriptomic profiling of the ventral tegmental area and nucleus accumbens in rhesus macaques following long-term cocaine self-administration. *Drug Alcohol Depend.* 175, 9–23. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2017.01.030>
- Verstrepen, L., Bekaert, T., Chau, T.-L., Tavernier, J., Chariot, A., Beyaert, R., 2008. TLR-4, IL-1R and TNF-R signaling to NF-kappaB: variations on a common theme. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 65, 2964–2978. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8064-8>
- Volkow, N.D., Wang, G.-J., Fowler, J.S., Thanos, P.P.K., Logan, J., Gatley, S.J., Gifford, A., Ding, Y.-S., Wong, C., Pappas, N., Thanos, P., 2002. Brain DA D2 receptors predict reinforcing effects of stimulants in humans: replication study. *Synap. N. Y. N* 46, 79–82. <https://doi.org/10.1002/syn.10137>
- World Drug Report 2020 (United Nations publication, Sales No. E.20.XI.6).
- Xia, Y.-F., Ye, B.-Q., Li, Y.-D., Wang, J.-G., He, X.-J., Lin, X., Yao, X., Ma, D., Slungaard, A., Hebbel, R.P., Key, N.S., Geng, J.-G., 2004. Andrographolide attenuates inflammation by inhibition of NF-kappa B activation through covalent modification of reduced cysteine 62 of p50. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 173, 4207–4217. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.6.4207>

- Xie, X., Jhaveri, K.A., Ding, M., Hughes, L.F., Toth, L.A., Ramkumar, V., 2007. Expression of striatal adenosine and dopamine receptors in mice deficient in the p50 subunit of NF- κ B. *Life Sci.* 81, 1031–1041.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.07.031>
- Yang, J., Yu, J., Jia, X., Zhu, W., Zhao, L., Li, S., Xu, C., Yang, C., Wu, P., Lu, L., 2011. Inhibition of nuclear factor- κ B impairs reconsolidation of morphine reward memory in rats. *Behav. Brain Res.* 216, 592–596.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.08.047>
- Yu, Z., Zhou, D., Bruce-Keller, A.J., Kindy, M.S., Mattson, M.P., 1999. Lack of the p50 subunit of nuclear factor-kappaB increases the vulnerability of hippocampal neurons to excitotoxic injury. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, 8856–8865.
- Zhu, R., Bu, Q., Fu, D., Shao, X., Jiang, L., Guo, W., Chen, B., Liu, B., Hu, Z., Tian, J., Zhao, Y., Cen, X., 2018. Toll-like receptor 3 modulates the behavioral effects of cocaine in mice. *J. Neuroinflammation* 15, 93.
<https://doi.org/10.1186/s12974-018-1130-8>

Figures

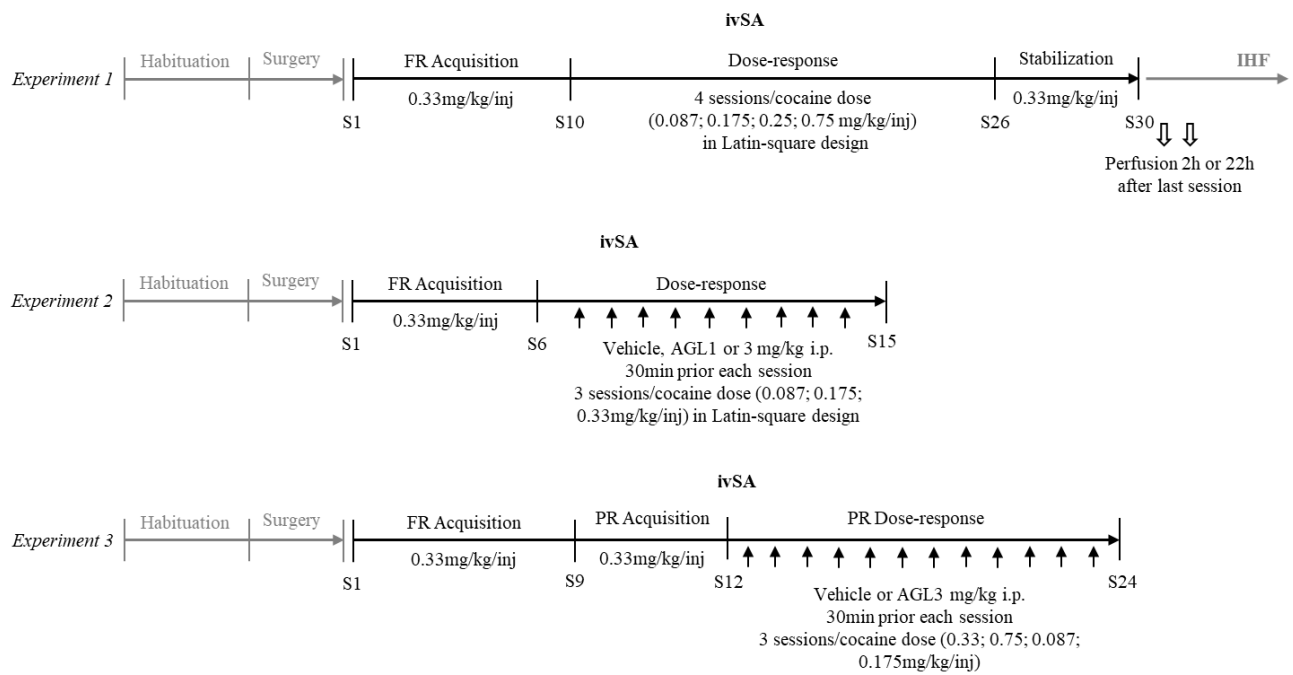


Figure 1: Behavioral protocols. *AGL*: andrographolide, *FR*: fixe-ratio schedule of reinforcement, *inj*: injections, *ivSA*: intravenous self-administration, *PR*: progressive-ratio schedule of reinforcement, *S* correspond to session numbers.

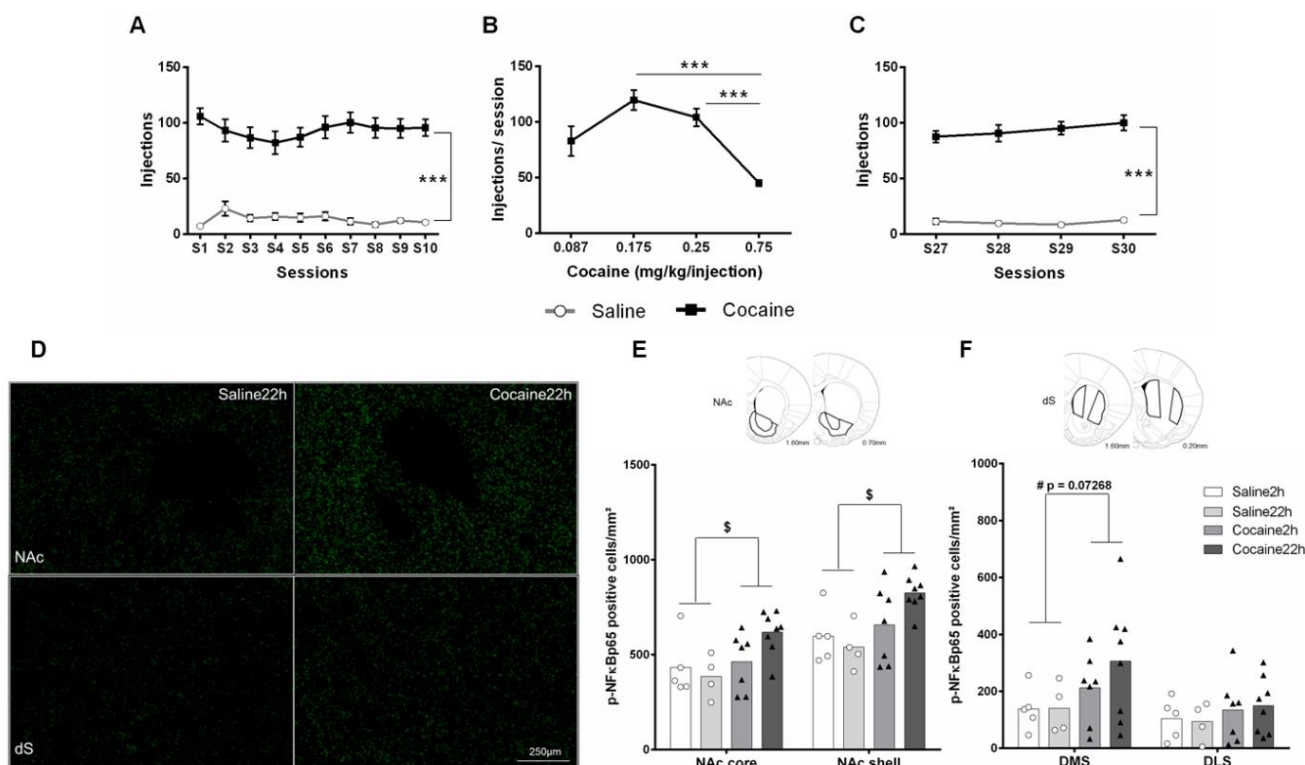


Figure 2: Number of p-NFκBp65 positive cells per mm² following one-month of cocaine ivSA. **A.** Number of injections during the 10 days of cocaine (0.33 mg/kg/injection) and saline (NaCl 0.9%) ivSA. **B.** Number of injections during the last day of each cocaine doses depicting a classical inverted U-shaped curve (cocaine doses effect: $F_{(2,27)} = 12.49$, $p < 0.001$). **C.** Number of injections during the last four days of cocaine (0.33 mg/kg/injection) and saline ivSA. **D.** Illustrative examples of p-NFκBp65 immunohistofluorescence pictures, observed at 20x objective, in the nucleus accumbens (NAc) and dorsal striatum (dS) of rats killed 22h after the last saline or cocaine ivSA session. **E.** p-NFκBp65/mm² counting in NAc sub-regions (core and shell) is significantly higher in cocaine ivSA rat than in saline ivSA, both in core ($F_{(1,21)} = 4.49$, $p = 0.046$) and shell ($F_{(1,21)} = 6.54$, $p = 0.018$). **F.** p-NFκBp65/mm² counting in dS sub-regions (DMS and DLS for dorsomedial and dorsolateral striatum, respectively) tend to be higher in DMS of cocaine ivSA rat than DMS of control rats ($F_{(1,21)} = 3.57$, $p = 0.073$) while no changes were observed in DLS. Stat: **A.** and **C.** Linear mixed models. **B.** Repeated measures ANOVA, t-test adjusted with Holm method *posthoc*, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$. **E.** and **F.** Two-way ANOVAs, \$ corresponding to simple treatment effect (cocaine vs saline), \$: $p < 0.05$.

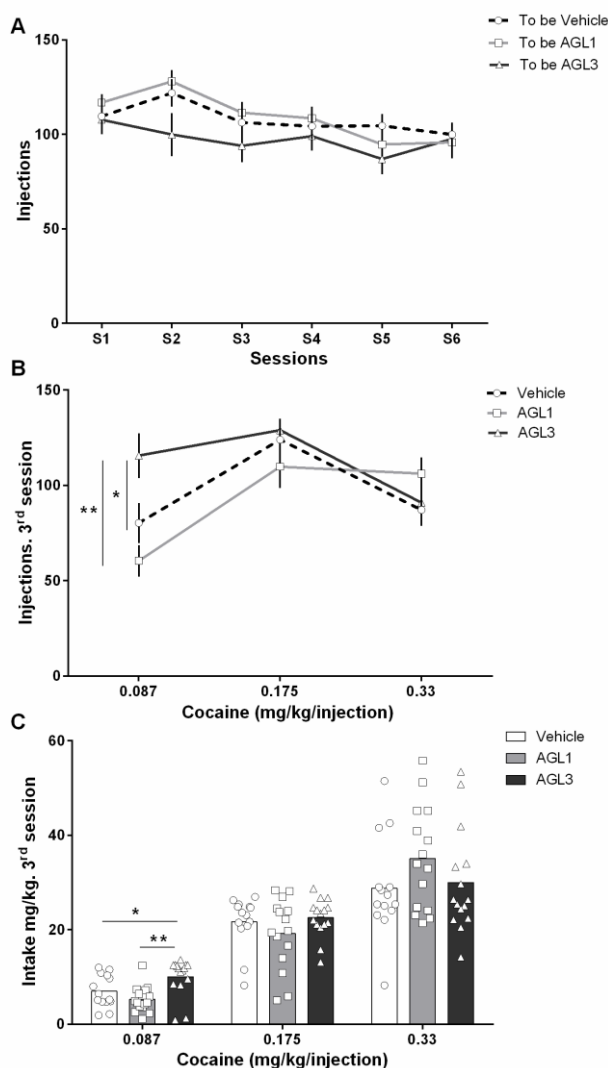


Figure 3: Effect of AGL (1 and 3 mg/kg, i.p., 30 min before the ivSA session) on cocaine dose-response curve during a fixed-ratio schedule of reinforcement. **A.** Number of injections during the 6 days of cocaine (0.33 mg/kg/injection) ivSA acquisition showing non-significant differences between future pharmacological conditions (Vehicle vs AGL 1 mg/kg, $t_{(219.1010)} = -1.421$, $p = 0.157$; Vehicle vs AGL 3 mg/kg, $t_{(219.1138)} = 0.23$, $p = 0.816$). **B.** Number of injections during the last day of each cocaine dose depicting a significant higher level of cocaine ivSA by AGL 3 mg/kg-treated rats at the 0.087 mg/kg/injection dose of cocaine (AGL 3 vs AGL 1, $p = 0.0012$; AGL 3 vs Vehicle, $p = 0.039$). **C.** Total cocaine intake (mg/kg) during the last day of each cocaine dose showing a significant higher intake by AGL 3 mg/kg-treated rats at the 0.087 mg/kg/inj dose of cocaine (AGL 3 vs AGL 1, $p = 0.0012$; AGL 3 vs Vehicle, $p = 0.039$). Stat: **A.** Linear mixed model. **B.** and **C.** Two-way mixed ANOVA, t-test adjusted with Holm method *posthoc*, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

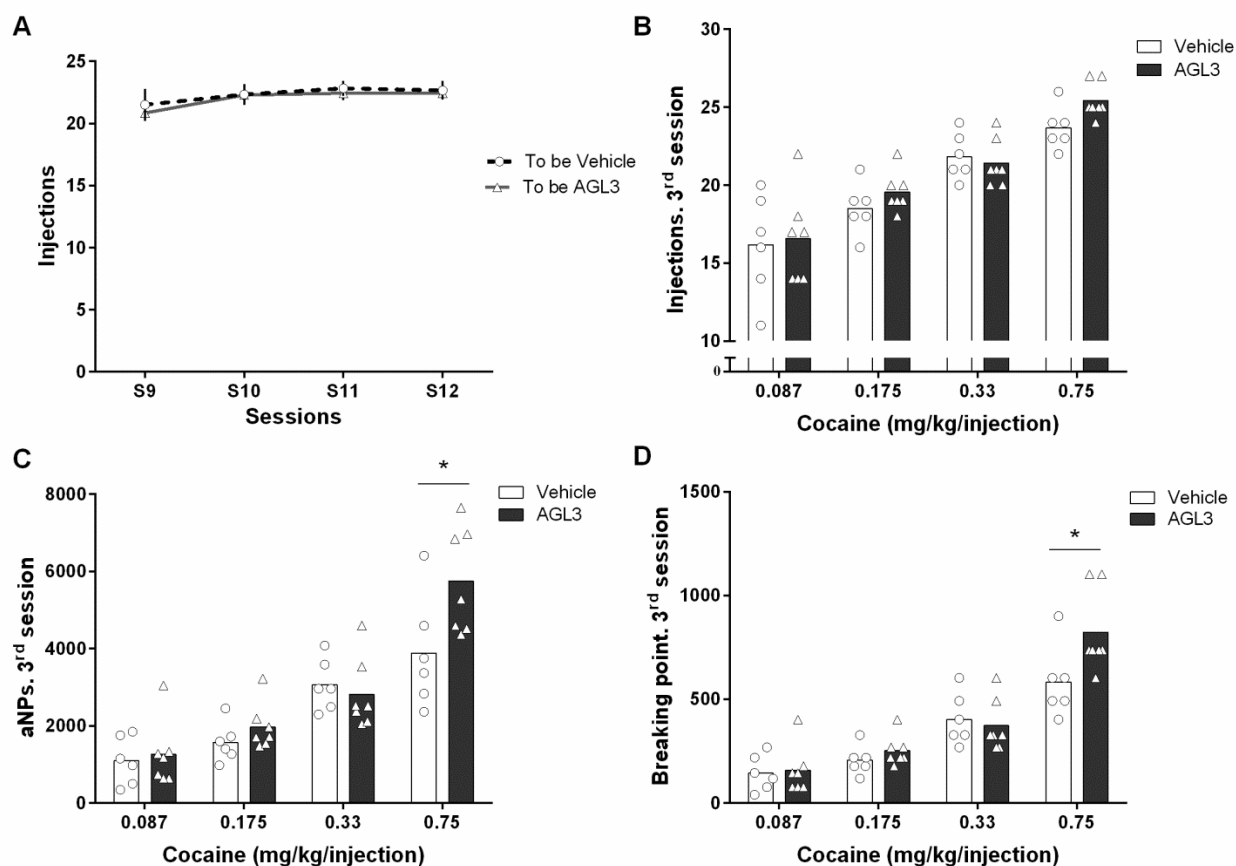
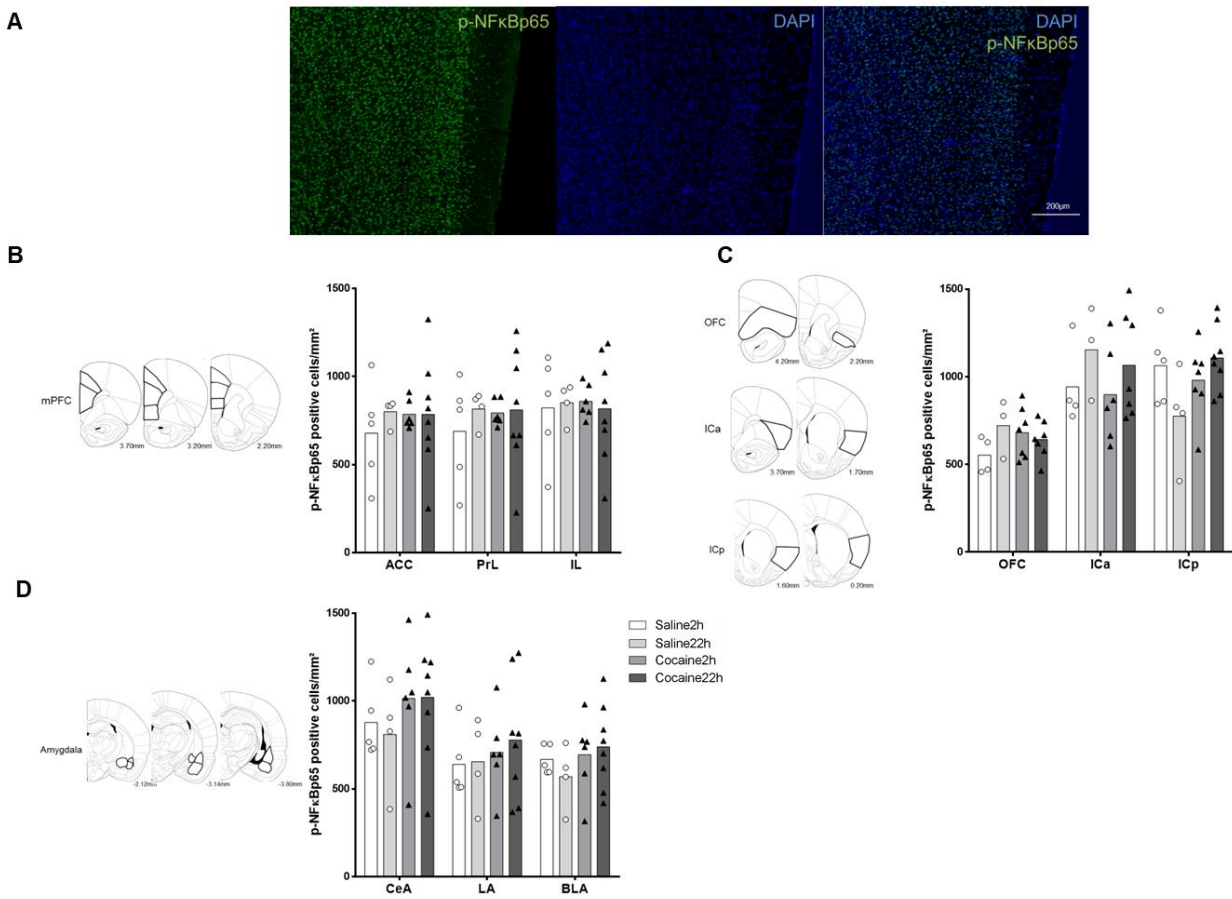


Figure 4: Effect of AGL (3 mg/kg, i.p., 30 min before starting of ivSA sessions) on cocaine dose-response during a progressive ratio schedule of reinforcement. **A.** Number of injections during the 6 days of acquisition of cocaine (0.33 mg/kg/injection) ivSA showing non-significant differences between future pharmacological conditions (LMM, $t_{(30)}=0.373$, $p = 0.711$). **B.** Number of injections during the last day of each cocaine dose, showing no treatment effect. **C.** Number of aNPs reached during the last day of each cocaine doses showing a significant higher level for AGL-treated rats at the highest dose of cocaine (Vehicle vs AGL at 0.75mg/kg/injection, $p = 0.037$). **D.** Breaking point reached during the last day of each cocaine dose demonstrating a significant higher level for AGL-treated rats (Vehicle vs AGL at 0.75mg/kg/injection, $p = 0.04$). Stat: **A.** Linear mixed model. **B., C.** and **D.** Two-way mixed ANOVA, t-test adjusted with Holm method *posthoc*, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.



Sup Fig 1: Number of p-NFκBp65 positive cells per mm² following one month of cocaine ivSA. **A.** Example of p-NFκBp65 staining co-localizing with DAPI at 20x objective, in the medial prefrontal cortex (mPFC), of a rat killer 22h after last cocaine ivSA. **B.** p-NFκBp65/mm² counting in mPFC sub-regions (prelimbic cortex, PrL, infralimbic cortex, IL, anterior cingulate cortex, ACC) did not show any treatment effect. **C.** p-NFκBp65/mm² counting in orbitofrontal cortex (OFC) and insula cortex (IC anterior and posterior) did not show any treatment effect. **D.** p-NFκBp65/mm² counting in amygdala (central amygdala, CeA, lateral amygdala, LA, and basolateral amygdala, BLA) sub-regions did not show any treatment effect. Stat: Two-way ANOVA.

Article II

NFκB pathway implication in cue-induced reinstatement of cocaine seeking: a reconsolidation mechanism?

Caroline Correia, Katia Befort[#] and Pascal Romieu^{#*}

Université de Strasbourg, Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives (LNCA), Centre de la Recherche Nationale Scientifique, UMR 7364, Faculté de Psychologie, 12 rue Goethe, F-67000, Strasbourg, France

Running title: Inhibition of NFκB alters cue-induced reinstatement

Key words

Cocaine, Neuroinflammatory markers, NFκB, Reconsolidation, Cues

***Corresponding author:** Pascal Romieu,

LNCA

Université de Strasbourg Faculté de Psychologie,

12 rue Goethe, F-67000

Strasbourg, France

romieu@unistra.fr

Co-last authors

Abbreviations

AGL: andrographolide, CHX: cycloheximide, DMSO: dimethyl sulfoxide, FR: fixed ratio, IL-1/6: interleukine 1/6, ivSA: intravenous self-administration, NAc: nucleus accumbens, NFκB: nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells, PSD-95: Postsynaptic density protein 95, aNP/iNP: active/inactive nose-poke

Abstract

Persistent and intrusive memories play a key role in maintaining certain psychiatric disorders, such as substance abuse. In this disorder, drug-paired cues are potent triggers for relapse, playing a critical role in sustaining drug use. Experimental data in animals confirmed that retrieved memories become transiently labile for a few hours post-retrieval: as altering a drug-cue memory reduced drug-seeking behavior. Although implicated primarily in inflammation, the nuclear factor κ B (NF κ B) also plays crucial role in learning and memory. In particular, NF κ B is involved in consolidation and reconsolidation of memories in different conditioning paradigms. Our study assessed the effect of NF κ B pharmacological inhibition on reconsolidation of cocaine-associated memories using an intravenous self-administration paradigm. Briefly, male rats were allowed to self-administer cocaine over 12 daily sessions under a FR1 schedule of reinforcement with cues was associated with each infusion. After instrumental extinction with no cue presentation, rats underwent one cue-associated memory reactivation session and were immediately injected with NF κ B inhibitors. Cue-induced reinstatement was assessed 24 h later. Our results show that two different NF κ B inhibitors reduced cocaine-seeking behavior, suggesting NF κ B involvement in the reconsolidation process. This effect was dependent on prior instrumental extinction.

Introduction

Cocaine addiction is a worldwide health problem as it affects millions of people. Cocaine consumption has been rising up this last decade throughout European countries, exacerbating the concerns about public health (World Drug Report, 2020). The reinforcing properties of cocaine lead to loss of control over consumption, producing compulsive drug seeking and taking despite negative consequences. Cocaine addiction is characterized by chronic relapse events, even after prolonged period of abstinence (Koob and Volkow, 2016) and no treatment is currently available. Context and environmental cues constitute one of the major triggers involved in the risk of relapse. The main hypothesis explaining an increased risk is the associations, strongly anchored into memory, between cues and the reinforcing effects of cocaine. Based on this, a new avenue of therapeutic research has emerged, with the targeting of memory processes in cocaine addiction to reduce these associations. Indeed, it is thought that some psychiatric disorders such as posttraumatic stress and addiction are characterized by persistent memories which prone the continuation of maladaptive behaviors (Bender and Torregrossa, 2020; Monfils and Holmes, 2018).

The consolidation/reconsolidation theory of memory supports that active processes are necessary to stabilize and store a labile memory trace after learning or recall of what has been learned (Gold and McGaugh, 1975; Lewis, 1979). Consolidation is needed for a new memory trace to be formed while reconsolidation occurs when the retrieval of a stored memory put it back into a labile form (Misanin et al., 1968; Nader et al., 2000). This theory defends that during a few hours window (when these processes occur) the labile memory trace can be updated, altered, weakened, or strengthened (Sandrini et al., 2015). This concept has been proposed to apply to drug addiction, with a particular focus on retrieval-inducing reconsolidation to weaken memories associated with cocaine intake in order to decrease the risk of relapse (Sorg, 2012; Torregrossa and Taylor, 2016). During the past few years, numerous studies have emphasized potential molecular mechanisms underlying cocaine-associated memories (summarized in Correia et al., 2020) leading to promising behavioral outcomes in terms of cocaine seeking, both in rodents and in humans (Lonergan et al., 2016). Nevertheless, more research is still needed in this field to identify specific molecular targets for efficient treatment and development of therapeutic approaches.

Among the common pathways stimulated by cocaine and involved in memory process, neuroinflammation is noteworthy (see Correia et al., 2020). Indeed, many studies have demonstrated the role of neuroinflammatory markers in memory (Yirmiya and Goshen, 2011) or emphasized a pro-inflammatory state upon cocaine intake (Clark et al., 2013; Lacagnina et al., 2017). Moreover, some of the effects demonstrated in cocaine-associated reconsolidation studies could also be explained by an impact on neuroinflammatory markers. Indeed, pharmacological agents like garcinol (Dunbar and Taylor, 2017) and cannabidiol (de Carvalho and Takahashi, 2017) used, respectively, as a histone acetylase inhibitor and a CB2 agonist decrease memory strength and cognate cocaine-seeking behavior, interestingly these agents also demonstrate anti-inflammatory properties (Kozela et al., 2017; Padhye et al., 2009).

Nuclear factor κ B (NF κ B) is a central component of the neuroinflammatory pathways (Brown et al., 2011). NF κ B is upregulated by acute and chronic injections of cocaine in rodents (Ang et al., 2001; Russo et al., 2009; Zhu et al., 2018b). Moreover, NF κ B modulates long term potentiation-induced plasticity (Albensi and Mattson, 2000), in part through the regulation of synaptic genes, including PSD95, NCAM or AMPAR subunits (Engelmann and Haenold, 2016). In addition, disruption of the NF κ B pathway can alter dendritic spine density in medium spiny neurons of the nucleus accumbens (NAc), a brain region particularly involved in cocaine addiction, after cocaine exposure (Russo et al., 2009). More importantly, perturbation of NF κ B activation during consolidation/reconsolidation, produced memory impairments in inhibitory avoidance (Freudenthal et al., 2005), fear conditioning (de la Fuente et al., 2014, 2011) and morphine CPP (Yang et al., 2011) paradigms.

Altogether, these results argue in favor of the involvement of the NF κ B in cocaine-associated memories, including those potentially implicated in relapse processes. To test this hypothesis, we assessed, through an intravenous cocaine self-administration paradigm in rats, the capacity of two NF κ B inhibitors, parthenolide and andrographolide, to alter cue-induced reinstatement of cocaine seeking through a reconsolidation process. We also examined whether NF κ B expression was modified following reactivation of cue-associated memory after extinction.

Methods

Animals

Male Wistar rats (n = 217 in total) were purchased from JanvierLabs (Le Genest-Saint-Isle, France) weighting 150-175 g upon arrival. Animals were housed in standard home cages (2 rats per cage), under a 12 h light/dark inverted cycle (lights ON at 8:00 P.M.) in a temperature- and humidity-controlled room. Animals had *ad libitum* access to food and water.

All experimental procedures were conducted in accordance with the European Communities Council Directive of 22 September 2010 (directive 2010/63/UE) and approved by the local ethical committee (Comité Régional d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animale de Strasbourg, CREMEAS #7052 and #17797).

Drugs

Cocaine hydrochloride was obtained from Cooper (#1164500, Melun, France) and dissolved in sterile saline solution (NaCl 0.9%) to achieve a dose of 0.33 mg/kg/injection. Andrographolide (AGL, Sigma Aldrich, #365645, St Louis, USA) and parthenolide (PTD, #sc-3523 Santa Cruz), two different NF κ B inhibitors, as well as, cycloheximide (CHX, #C7698-1G Sigma Aldrich), a *de novo* protein synthesis inhibitor (Dunbar and Taylor, 2016), were dissolved in dimethylsulfoxyde (DMSO) 1.5% (i.e., vehicle). Pharmacological agents or vehicle were injected intraperitoneally (i.p.) at 2 mL/kg body weight.

Surgery

After two weeks of habituation to the facility and the experimenter, rats underwent surgery to implant an intravenous indwelling catheter (Romieu et al., 2008). Briefly, rats were anesthetized by a

mixture of ketamine (90 mg/kg, i.p. Imalgene 1000, Merial) and xylazine (10 mg/kg, i.p. Rompun® 2%, Bayer). They were treated by meloxicam (anti-inflammatory agent, 1 mg/kg, s.c. Metacam®, Boehringer Ingelheim), and by lidocaine at both incision sites (1 mg/kg each, s.c. Lurocaïne, Vétoquinol). The catheter (0.025“X 0.047”X 0.011”, Phymep) was introduced in the right jugular vein and connected to a 23-gauge guide cannula mounted on the back of the rats. After surgery, rats were single house for a minimum of 5 days to recover. Starting at the end of surgery and daily throughout experiment, catheters were flushed with heparin (200 µl, 100 U/ml, Héparine Choay®, Sanofi) solution in order to keep catheters patent.

Behavioral procedures

Apparatus

Implanted drug-naïve rats were submitted to cocaine intravenous self-administration (ivSA) in home-made operant chambers (20 x 20 x 30 cm) containing two nose-pokes (NP) holes (ø 2.5 cm) (previously described with slight modifications in Romieu et al., 2008). One hole was active (aNP), leading to cocaine injection, while the other one was inactive (iNP), leading to no programmed consequences. Sliding doors were blocking the holes NPs before the start and after the end of sessions. A catheter SILASTIC® tubing (0.025“X 0.047”X 0.011”, Phymep) was connected to a syringe pump (Imetronic®). Chambers were controlled by LabView® (National Instruments) software, which allows recording of the numbers of injections, and active / inactive NP (aNPs / iNPs).

Cocaine ivSA acquisition

Intravenous SA was carried out daily. Each session lasted 105 min with a fixed ratio (FR) 1 schedule of reinforcement. Each injection (cocaine 0.33 mg/kg/injection or NaCl 0.9%) was accompanied by a 5s cue-light above the aNP and followed by a 35s house-light corresponding to a total of 40s time-out period. Each injection was also associated with the pump motor sound which lasts 2s upon injection. Hence, injected volume, pump sound, cue-light and house-light are all considered as discrete signals potentially associated to cocaine's effects and will be referred as “cues”. Acquisition of cocaine ivSA was validated when rats earned a minimum of 30 injections during the session and displayed a percentage of aNPs above 70%. For the molecular experiments, controls rats underwent the same protocol but received only NaCl 0.9% (saline) i.v. injections.

Instrumental extinction

Twenty-four hours after the last intake session, instrumental extinction was carried out in the same context for 105 min daily sessions. During this phase, cocaine was never delivered, and rats were never exposed to cues. NPs in active and inactive holes were recorded and instrumental extinction was validated when rats significantly decreased their aNPs by at least 75% of their activity of the first day of extinction.

Forced abstinence

Rats were left undisturbed in their home cages for one month, with only daily manipulation for heparin injections through intravenous catheter.

Re-exposure of animals to cues (memory reactivation) and pharmacological treatment (memory manipulation)

After instrumental extinction. Memory reactivation phase was initiated 24 h after the last instrumental extinction. Rats were placed for 1 h in a context different than the one used for cocaine ivSA and instrumental extinction. Briefly, conditioning boxes were modified as follow: smooth floor was overlaid by a 3 cm wood chips litter, smooth walls were recovered by stainless steel grid and holes were blocked by sliding doors covered with felt. Twenty-four hours after this habituation to the new context, rats were placed in this context and cue-memory reactivation was performed during a 10 min session: after a 5 min period of latency, all cues (lights, pump sound, intravenous injection of NaCl 0.9%) were presented in the same time-sequence as during cocaine acquisition four times interspaced by a 30s period. Four presentations of cues were chosen as this number of presentations was shown to induce reconsolidation but not extinction (Rich et al., 2016; Torregrossa et al., 2019).

After forced abstinence. Memory reactivation occurred in the same context than the one used for cocaine acquisition, with a similar protocol as the one just described.

Administration of NFκB inhibitors occurred right after the animals were re-exposed to cocaine-associated cues, i.e. during the reconsolidation period. Rats received an injection of vehicle (DMSO 1.5%) or NFκB inhibitor, AGL (1 or 3 mg/kg) or PTD (0.3, 1 or 3 mg/kg). CHX (2.2 mg/kg) was used as a positive control as inhibition of *de novo* protein synthesis has been shown to consequently impact cues-associated reconsolidation (Dunbar and Taylor, 2016).

Cue-induced reinstatement

Twenty-four hours after the memory reactivation to cues and pharmacological treatment, a cue-induced reinstatement session was performed. Rats were placed in the ivSA context for a 105 min

session. Each aNP resulted in the contingent presentation of cocaine-associated cues as during cocaine acquisition. NaCl 0.9% was substituted for cocaine. iNPs were recorded but had no programmed consequences.

Brain dissection

For molecular studies, rats were sacrificed 30 min post cue-reactivation by an i.v. injection of sodic pentobarbital (182 mg/kg, Euthasol® Vet, Dechra). Brains were dissected (amygdala and NAc) for RNA and protein analyses. In this experiment four group of rats were processed (saline no-reactivation, SNR, saline reactivation, SR, cocaine no-reactivation, CNR, and, cocaine reactivation, CR). Brain samples were immediately frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C.

RNA extraction

RNA extraction was carried out on the amygdala and the NAc using RiboZol™ Reagent (VWR life science) according to the standard protocol and previously described (de Sa Nogueira et al., 2020). Briefly, tissues were homogenized in 1 mL RiboZol™ Reagent and incubated 10 min at room temperature. After the addition of 200 µL chloroform, samples were vigorously shaken, incubated 3 min at room temperature and centrifuged at 12,000 g for 10 min at 4°C. Supernatants were mixed with 500 µL isopropanol, incubated 10 min at room temperature and centrifuged at 12,000 g for 15 min at 4°C. RNA pellets were washed twice (75% ethanol) and further dried. Finally, RNAs were dissolved in 40 µL pure water and quantified using a NanoVue™ plus spectrophotometer (Biochrom, Fisher Scientific).

Reverse Transcription and Quantitative Polymerase Chain Reaction

Reverse transcriptions were processed using “Iscrip Reverse Transcriptase SuperMix” (Biorad) from 750 ng of RNA in a final volume of 20 µL, with the following steps: 5 min 25°C, 30 min 42°C, 5 min 85°C.

Quantitative Polymerase Chain Reactions (qPCR) were performed using “SsoAdvanced Sybr Green” (Biorad, #172-5275) following the manufacturer’s protocol, using 0.5 µL cDNA. Thermal cycling parameters were 30s at 95°C followed by 40 cycles of 5s at 95°C and 45s at 60°C

Primer sequences: Rplp0: F, CTGCCCCGAGCCGGTGCCATC, R, TTCAATGGTACCTCTGGAGAT; IL1α: F, CCATCCAACCCAGATCAGCA, R, TGAACCTCCTGCTTGACGATCC; IL1β: F,

GGGGAAGTGTGCAGACTCAA, R, CAGCTGGAGAGTGTGGATCC; IL6: F, GCTCTGGTCTTCTGGCGTTCC, R, TGCTCTGAATGACTCTGGCT; p105: F, TTTGCAAC-TATGTGGGGCCT, R, TGGGCGTGCAGGTGAATATT; p65: F, CTCATCTTCCCTCAGAGCCAG, R, CCCGTGTAGCCATTGATCTTG; PSD95: F, CAC-CTCCCAACCAGGCCAAT, R, CCTCTGTTCCATTCACCTGCAAC.

Western blot

Nuclear protein extractions were prepared from the same brains' samples using the "ab113474" kit (Abcam®) and quantified using Qubit 4 (ThermoFisher Scientific). Western blots were carried out using 30 µg nuclear protein extracts following a standard procedure. Briefly, proteins were loaded on "4-15% Criterion™ TGX Stain-Free™ Precast gels" (Bio-Rad #567-8085), and "Trans-Blot® Turbo™ Transfert System" (BioRad #1704157) were used to transfer the protein on PVDF membrane. Aspecific sites were blocked by I-BLOCK™ (Applied Biosystem™) dissolved in PBS-Tween0.1% in which both primary: 1/2000 anti-ac-NFκBp65 (AcK310) (CPA3309); 1/2000 anti-NFκBp65 (D14E12) XP® (sc8242); as well as secondary: 1/4000 anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP Conjugate (Bio-Rad 1706515), antibodies were diluted. Primary antibodies were incubated overnight at 4°C and secondary antibody for 1 h at room temperature. Stain free imaging were used for normalization with the total protein content from 10kDA to 250kDA.

Statistics

All analyses were carried out using RStudio (1.1.463) software. All results are expressed as individual dot histograms. Linear mixed model (LMM) was used to compare the reinstatement slopes between treated and control rats with "treatment" and "session" (repeated measures from last extinction and reinstatement sessions) as variables (between- and within-factors, respectively) taking in account fixed and random effects. A Wilcoxon t-test was used to compare the seeking-behavior of both treatment groups after the period of forced abstinence. Two-way ANOVA analyses were used in molecular experiments to determine differences in protein or RNA levels in separated brain regions with "cocaine" and "reactivation" as variables (between-subject factors). Normality and Homogeneity of variance were verified using Shapiro-Wilk and Bartlett tests, respectively. Log or BoxLox transformations of the response variable were used to counter assumptions violations.

Results

Effect of NFκB inhibition on cue-associated reconsolidation after instrumental extinction

To evaluate the potential involvement of NFκB on cocaine cue-associated memories in rats, we measured the effect of two different NFκB inhibitors (AGL and PTD) systemically administered right after a memory reactivation protocol.

We developed a reactivation-induced reconsolidation protocol adapted from the literature (Dunbar and Taylor, 2016). Rats were trained to cocaine (0.33 mg/kg/injection) ivSA behavior. After acquisition of a stable behavior, rats' instrumental behavior was extinguished through repeated extinction sessions. This reactivation paradigm (**Figure 1A**) was first validated using an inhibitor of protein synthesis as a positive control (CHX 2.2 mg/kg). Indeed, several studies have supported that reconsolidation is a *de novo* protein synthesis dependent mechanism (Dunbar and Taylor, 2016; Sorg et al., 2015; Zhu et al., 2018a) that impacts reinstatement only in a reactivation-dependent manner. CHX was given systemically right after a brief exposure to the cocaine-associated cues. A linear mixed model analysis revealed a significantly reduced reinstatement slope for CHX rats when compared to vehicle-treated rats ($t_{(18)} = -2.395$, $p = 0.027$) (**Figure 1B**). This result confirmed a mechanism involving a *de novo* protein synthesis in our paradigm.

We then tested the two NFκB inhibitors in this paradigm. A linear mixed model analysis showed a significantly decreased cue-induced reinstatement 24 h later in animals treated by PTD or AGL (PTD 0.3 mg/kg ($t_{(63)} = -2.267$, $p = 0.027$), PTD 1 mg/kg ($t_{(63)} = -2.701$, $p = 0.008$), AGL 3 mg/kg ($t_{(63)} = -3.854$, $p < 0.001$) and AGL 10 mg/kg ($t_{(63)} = -3.386$, $p = 0.001$)) in comparison to vehicle-treated rats (**Figure 1C**). Interestingly, the effect of PTD was dose-dependent since the 3 mg/kg dose was ineffective (PTD3 ($t_{(63)} = -1.533$, $p = 0.13$)). Overall, these results support that the NFκB inhibitors disrupted cue-associated reconsolidation as a decrease in cue-induced reinstatement can be explained by a weakened association between cues and cocaine, suggesting that NFκB is necessary for cocaine-associated cues reconsolidation.

Effect of NFκB inhibition on cue-associated reconsolidation following forced abstinence

In a second experiment, we attend assessed the effect of PTD on reconsolidation of cocaine cues memory when neither the instrumental behavior nor the context were extinguished. Only PTD at the dose of 1 mg/kg was tested as it significantly reduced cue-induced reinstatement in the first experiment. A similar paradigm of cocaine intake was used, followed by a one month-period of forced ab-

stinence (**Figure 2A**). There was no statistical difference between vehicle-treated and PTD1-treated rats on their cocaine-seeking behavior ($p = 1$, **Figure 2B**) implying that PTD at 1 mg/kg does not impact cue-induced reinstatement without prior instrumental extinction. This result suggests a specific cocaine-associated cue reconsolidation function of NF κ B as its inhibition does not impact cocaine-seeking behavior when the instrumental behavioral and/or context were not previously extinguished.

Proteins and RNAs assessment during cue-associated reconsolidation

To evaluate at a molecular level the possible involvement of NF κ B and its downstream target genes during the reactivation-induced reconsolidation phase, we performed qPCR and western blot analyses from amygdala and NAc, two brain structures highly involved in associative memory (Bender and Torregrossa, 2020). To do so, four groups of rats were submitted to cocaine or saline ivSA followed by an instrumental extinction phase. They were further divided into two sub-groups, rats receiving four presentations of all cue-sequence in the new context and rats with no cue-presentation while being exposed to the same new context. At a protein level, we investigated the acetylated form of p65 (ac-NF κ Bp65) and NF κ Bp65. We did not observe any modification of the nuclear quantification of ac-NF κ Bp65 or total NF κ Bp65 in amygdala (**Figure 3A**) or NAc (**Figure 3B**). No interaction between history of cocaine and reactivation was obtained nor simple effect of history of cocaine (cocaine *versus* saline), and reactivation-induced reconsolidation of cue-associated memory (reactivation *versus* no-reactivation). At the RNA level, we examined the expression of IL-1 α , IL-1 β , IL-6, NF κ Bp105, NF κ Bp65 and PDS-95. We only observed some interesting tendencies for NF κ Bp105 (NF κ Bp50 precursor) and IL-6 in the amygdala (**Figure 4A**). The former displayed a trend for a simple memory effect ($F_{(1,29)} = 3.644$, $p = 0.0662$) and the latter displayed a trend for a cocaine x reactivation interaction ($F_{(1,28)} = 3.4701$, $p = 0.073$). No other modulation was observed for the other tested genes (**Figure 4**). These results suggest a possible involvement of NF κ Bp105 and IL-6 in the reactivation-induced cue-reconsolidation.

References

- Albensi, B.C., Mattson, M.P., 2000. Evidence for the involvement of TNF and NF-kappaB in hippocampal synaptic plasticity. *Synap. N. Y. N* 35, 151–159. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2396\(200002\)35:2<151::AID-SYN8>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2396(200002)35:2<151::AID-SYN8>3.0.CO;2-P)
- Ang, E., Chen, J., Zagouras, P., Magna, H., Holland, J., Schaeffer, E., Nestler, E.J., 2001. Induction of nuclear factor-kappaB in nucleus accumbens by chronic cocaine administration. *J. Neurochem.* 79, 221–224.
- Bender, B.N., Torregrossa, M.M., 2020. Molecular and circuit mechanisms regulating cocaine memory. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 77, 3745–3768. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03498-8>
- Brown, J., Wang, H., Hajishengallis, G.N., Martin, M., 2011. TLR-signaling networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk. *J. Dent. Res.* 90, 417–427. <https://doi.org/10.1177/0022034510381264>
- Clark, K.H., Wiley, C.A., Bradberry, C.W., 2013. Psychostimulant abuse and neuroinflammation: emerging evidence of their interconnection. *Neurotox. Res.* 23, 174–188. <https://doi.org/10.1007/s12640-012-9334-7>
- Correia, C., Romieu, P., Olmstead, M.C., Befort, K., 2020. Can cocaine-induced neuroinflammation explain maladaptive cocaine-associated memories? *Neurosci. Biobehav. Rev.* 111, 69–83. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.01.001>
- de Carvalho, C.R., Takahashi, R.N., 2017. Cannabidiol disrupts the reconsolidation of contextual drug-associated memories in Wistar rats. *Addict. Biol.* 22, 742–751. <https://doi.org/10.1111/adb.12366>
- de la Fuente, V., Federman, N., Fustiñana, M.S., Zalzman, G., Romano, A., 2014. Calcineurin phosphatase as a negative regulator of fear memory in hippocampus: control on nuclear factor-κB signaling in consolidation and reconsolidation. *Hippocampus* 24, 1549–1561. <https://doi.org/10.1002/hipo.22334>
- de la Fuente, V., Freudenthal, R., Romano, A., 2011. Reconsolidation or extinction: transcription factor switch in the determination of memory course after retrieval. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 5562–5573. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6066-10.2011>
- de Sa Nogueira, D., Bourdy, R., Filliol, D., Quessada, C., McCort-Tranchepain, I., Acher, F., Zwiller, J., Romieu, P., Befort, K., 2020. LSP2-9166, an orthosteric mGlu4 and mGlu7 receptor agonist, reduces cocaine self-administration under a progressive ratio schedule in rats. *Neurosci. Lett.* 135603. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.135603>
- Dunbar, A.B., Taylor, J.R., 2017. Garcinol Blocks the Reconsolidation of Multiple Cocaine-Paired Cues after a Single Cocaine-Reactivation Session. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 42, 1884–1892. <https://doi.org/10.1038/npp.2017.27>
- Dunbar, A.B., Taylor, J.R., 2016. Inhibition of protein synthesis but not β-adrenergic receptors blocks reconsolidation of a cocaine-associated cue memory. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 23, 391–398. <https://doi.org/10.1101/lm.042838.116>
- Engelmann, C., Haenold, R., 2016. Transcriptional Control of Synaptic Plasticity by Transcription Factor NF-κB. *Neural Plast.* 2016, 7027949. <https://doi.org/10.1155/2016/7027949>
- Freudenthal, R., Boccia, M.M., Acosta, G.B., Blake, M.G., Merlo, E., Baratti, C.M., Romano, A., 2005. NF-kappaB transcription factor is required for inhibitory avoidance long-term memory in mice. *Eur. J. Neurosci.* 21, 2845–2852. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04126.x>
- Koob, G.F., Volkow, N.D., 2016. Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *Lancet Psychiatry* 3, 760–773. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(16\)00104-8](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(16)00104-8)
- Kozela, E., Juknat, A., Vogel, Z., 2017. Modulation of Astrocyte Activity by Cannabidiol, a Nonpsychoactive Cannabinoid. *Int. J. Mol. Sci.* 18. <https://doi.org/10.3390/ijms18081669>
- Lacagnina, M.J., Rivera, P.D., Bilbo, S.D., 2017. Glial and Neuroimmune Mechanisms as Critical Modulators of Drug Use and Abuse. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 42, 156–177. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.121>
- Lewis, D.J., 1979. Psychobiology of active and inactive memory. *Psychol. Bull.* 86, 1054–1083.
- Lonergan, M., Saumier, D., Tremblay, J., Kieffer, B., Brown, T.G., Brunet, A., 2016. Reactivating addiction-related memories under propranolol to reduce craving: A pilot randomized controlled trial. *J. Behav. Ther. Exp. Psychiatry* 50, 245–249. <https://doi.org/10.1016/j.jbtep.2015.09.012>
- Misanin, J.R., Miller, R.R., Lewis, D.J., 1968. Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science* 160, 554–555. <https://doi.org/10.1126/science.160.3827.554>

- Monfils, M.H., Holmes, E.A., 2018. Memory boundaries: opening a window inspired by reconsolidation to treat anxiety, trauma-related, and addiction disorders. *Lancet Psychiatry* 5, 1032–1042. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(18\)30270-0](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(18)30270-0)
- Nader, K., Schafe, G.E., Le Doux, J.E., 2000. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* 406, 722–726. <https://doi.org/10.1038/35021052>
- Padhye, S., Ahmad, A., Oswal, N., Sarkar, F.H., 2009. Emerging role of Garcinol, the antioxidant chalcone from *Garcinia indica* Choisy and its synthetic analogs. *J. Hematol. Oncol.* *J Hematol Oncol* 2, 38. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-2-38>
- Rich, M.T., Abbott, T.B., Chung, L., Gulcicek, E.E., Stone, K.L., Colangelo, C.M., Lam, T.T., Nairn, A.C., Taylor, J.R., Torregrossa, M.M., 2016. Phosphoproteomic Analysis Reveals a Novel Mechanism of CaMKII α Regulation Inversely Induced by Cocaine Memory Extinction versus Reconsolidation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 36, 7613–7627. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1108-16.2016>
- Romieu, P., Host, L., Gobaille, S., Sandner, G., Aunis, D., Zwiller, J., 2008. Histone deacetylase inhibitors decrease cocaine but not sucrose self-administration in rats. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 9342–9348. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0379-08.2008>
- Russo, S.J., Wilkinson, M.B., Mazei-Robison, M.S., Dietz, D.M., Maze, I., Krishnan, V., Renthal, W., Graham, A., Birnbaum, S.G., Green, T.A., et al., 2009. Nuclear factor kappa B signaling regulates neuronal morphology and cocaine reward. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 3529–3537. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6173-08.2009>
- Sandrini, M., Cohen, L.G., Censor, N., 2015. Modulating reconsolidation: a link to causal systems-level dynamics of human memories. *Trends Cogn. Sci.* 19, 475–482. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2015.06.002>
- Sorg, B.A., 2012. Reconsolidation of drug memories. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 36, 1400–1417. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2012.02.004>
- Sorg, B.A., Todd, R.P., Slaker, M., Churchill, L., 2015. Anisomycin in the medial prefrontal cortex reduces reconsolidation of cocaine-associated memories in the rat self-administration model. *Neuropharmacology* 92, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.12.029>
- Torregrossa, M.M., MacDonald, M., Stone, K.L., Lam, T.T., Nairn, A.C., Taylor, J.R., 2019. Phosphoproteomic analysis of cocaine memory extinction and reconsolidation in the nucleus accumbens. *Psychopharmacology (Berl.)* 236, 531–543. <https://doi.org/10.1007/s00213-018-5071-9>
- Torregrossa, M.M., Taylor, J.R., 2016. Neuroscience of learning and memory for addiction medicine: from habit formation to memory reconsolidation. *Prog. Brain Res.* 223, 91–113. <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2015.07.006>
- World Drug Report 2020 (United Nations publication, Sales No. E.20.XI.6).
- Yang, J., Yu, J., Jia, X., Zhu, W., Zhao, L., Li, S., Xu, C., Yang, C., Wu, P., Lu, L., 2011. Inhibition of nuclear factor- κ B impairs reconsolidation of morphine reward memory in rats. *Behav. Brain Res.* 216, 592–596. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.08.047>
- Yirmiya, R., Goshen, I., 2011. Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. *Brain. Behav. Immun.* 25, 181–213. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.10.015>
- Zhu, H., Zhou, Y., Liu, Z., Chen, X., Li, Y., Liu, X., Ma, L., 2018a. β 1-Adrenoceptor in the Central Amygdala Is Required for Unconditioned Stimulus-Induced Drug Memory Reconsolidation. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 21, 267–280. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyx104>
- Zhu, R., Bu, Q., Fu, D., Shao, X., Jiang, L., Guo, W., Chen, B., Liu, B., Hu, Z., Tian, J., Zhao, Y., Cen, X., 2018b. Toll-like receptor 3 modulates the behavioral effects of cocaine in mice. *J. Neuroinflammation* 15, 93. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1130-8>

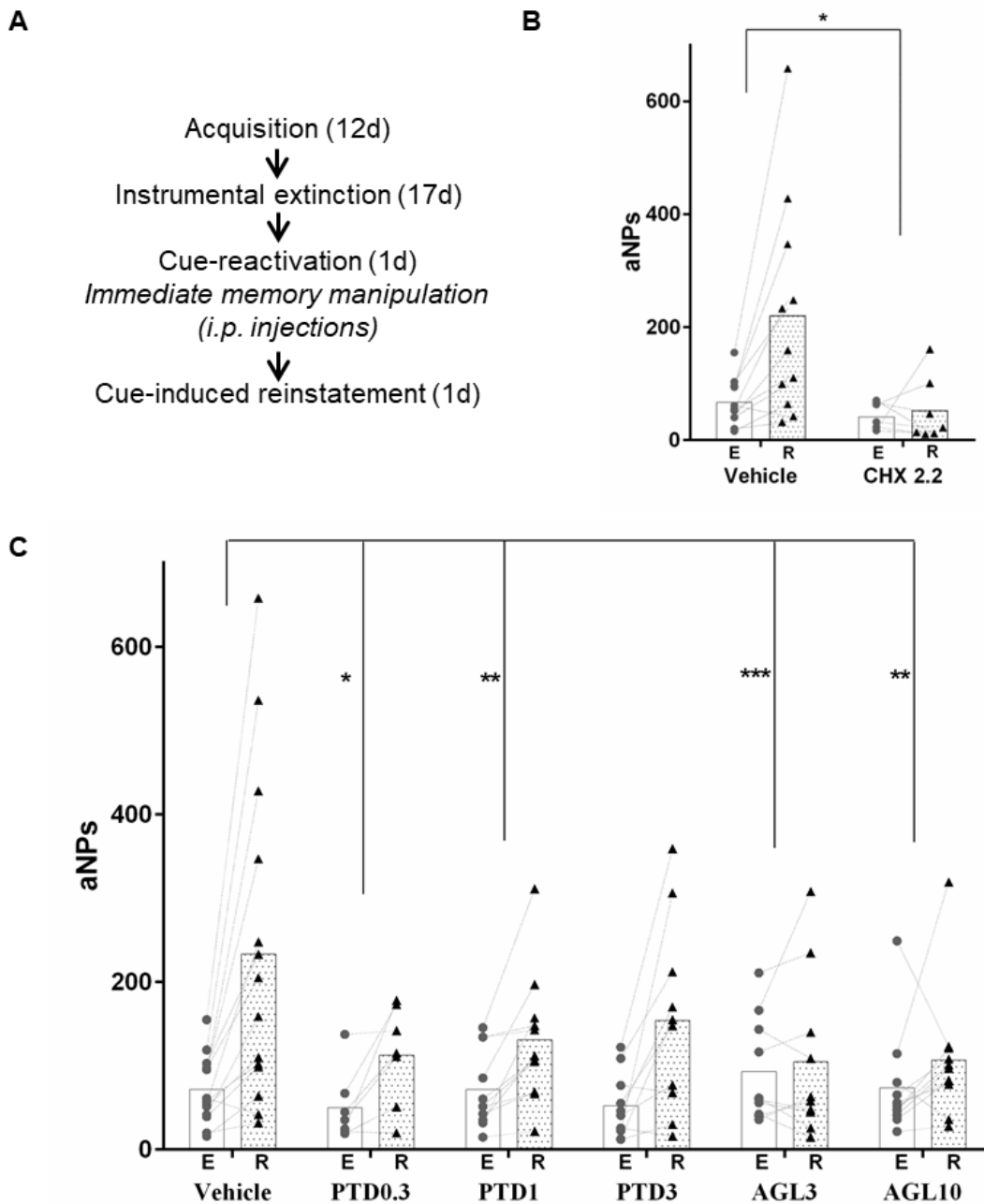


Figure 1: (A) Behavioral paradigm. (B) Validation of our memory reactivation protocol with an impairment of cue-associated reconsolidation by a protein synthesis inhibitor treatment as it prevents cue-induced reinstatement on a 24-h later test (CHX2.2 [$t_{(18)} = -2.395$, $p = 0.027$]). (C) Two different NF κ B inhibitors disrupt cue-associated reconsolidation on a dose-dependent manner as they significantly reduce cue-induced reinstatement 24-h later (PTD0.3 [$t_{(63)} = -2.267$, $p = 0.027$], PTD1 [$t_{(63)} = -2.701$, $p = 0.008$], AGL3 [$t_{(63)} = -3.854$, $p < 0.001$] and AGL10 [$t_{(63)} = -3.386$, $p = 0.001$]). aNPs: active nose-pokes, E = extinction, R = cue-induced reinstatement, Vehicle (DMSO1.5%, $n=11$ in B or 14 in C), CHX 2.2 mg/kg, i.p. ($n=7$), PTD 0.3mg/kg, i.p. (PTD0.3, $n=7$), 1 mg/kg, i.p. (PTD1, $n=11$), 3 mg/kg, i.p. (PTD3, $n=10$), and AGL3 mg/kg, i.p. (AGL3, $n=10$), 10 mg/kg, i.p. (AGL10, $n=11$). Stat: LMM *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.0001$.

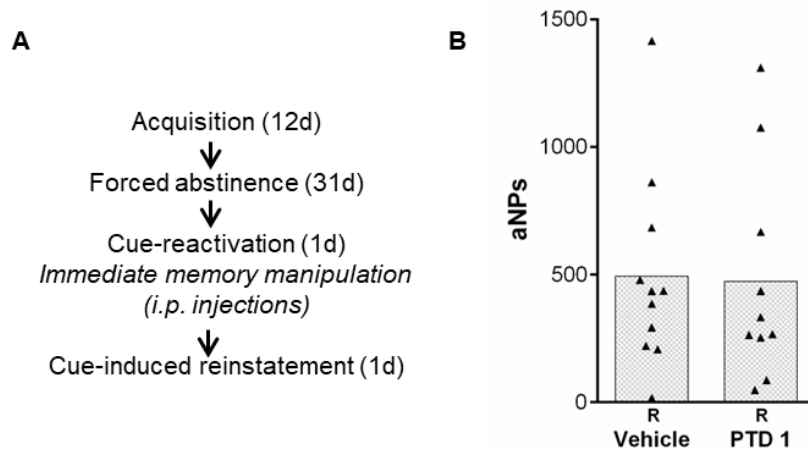


Figure 2: (A) Behavioral paradigm. (B) NFκB inhibitor, PTD, does not impact cue-associated reconsolidation without prior instrumental extinction (PTD1, $p = 1$). aNPs: active nose-pokes, R = cue-induced reinstatement, vehicle (DMSO1.5%, $n=10$), PTD 1 mg/kg, i.p. (PTD1, $n=9$). Stat: Wilcoxon t-test

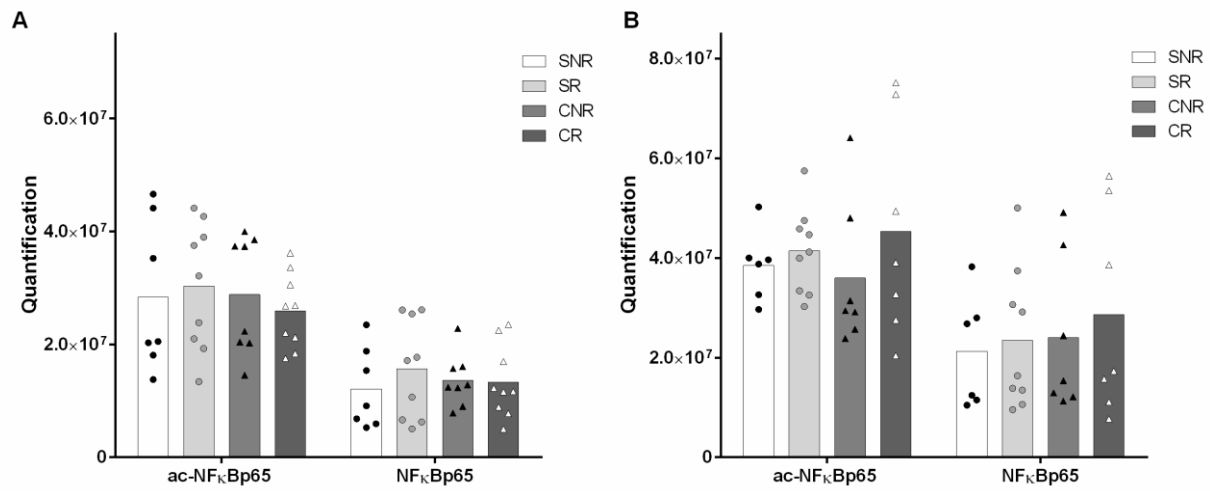


Figure 3: Nuclear protein quantifications of ac-NFκBp65 and total NFκBp65 are not impacted by cocaine and/or memory-reactivation neither in the amygdala (**A**) (ac-NFκBp65: $F_{(1,29)} = 0.44$ $p = 0.51$; NFκBp65: $F_{(1,29)} = 0.69$ $p = 0.41$) nor in the NAc (**B**) (ac-NFκBp65: $F_{(1,25)} = 0.24$ $p = 0.62$; NFκBp65: $F_{(1,25)} = 0.00$ $p = 0.99$). SNR: saline no-reactivation ($n = 7$), SR: saline reactivation ($n = 9$), CNR: cocaine no-reactivation ($n = 8$), and CR : cocaine reactivation ($n = 9$). Stat: Two-way ANOVA

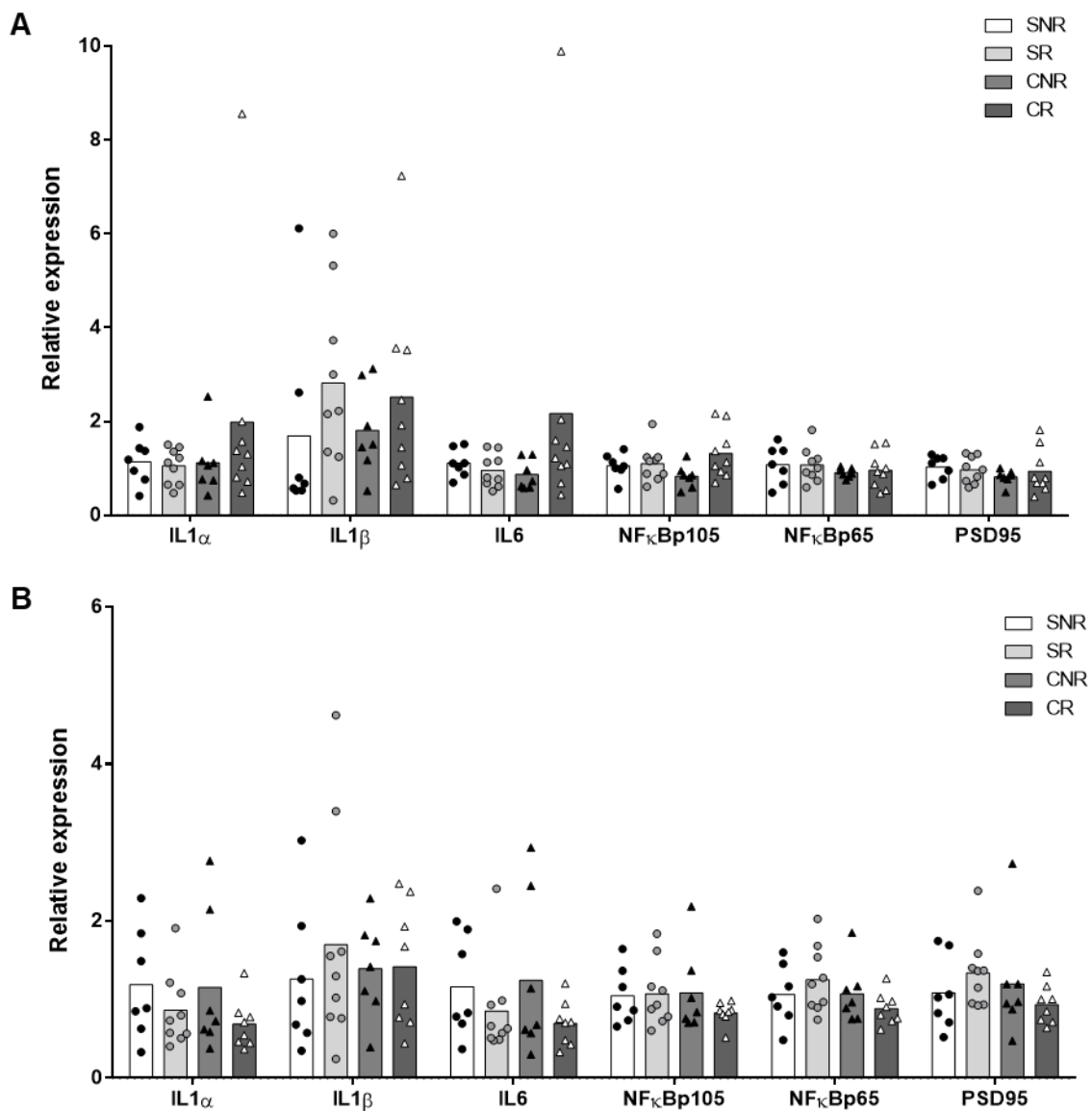


Figure 4: Total RNA quantifications of multiples NF κ B target genes are not changed by cocaine or memory-reactivation neither in the amygdala (A) nor in the NAc (B). Only the NF κ Bp50 precursor, NF κ Bp105 displays a trend for a reactivation effect ($F_{(1,24)} = 3.644, p = 0.066$) and IL-6 a trend for a cocaine x reactivation interaction ($F_{(1,28)} = 3.4701, p = 0.073$). SNR: saline no-reactivation ($n = 7$), SR: saline reactivation ($n = 9$), CNR: cocaine no-reactivation ($n = 8$), and CR : cocaine reactivation ($n = 9$). Stat: Two-way ANOVA

Annexe 1

Ces résultats correspondent à un résultat supplémentaire de l'expérience 2 (Article I) et présentent le nombre de NP inactifs lors du traitement par l'AGL dans le protocole d'AAiv de cocaïne (FR) :

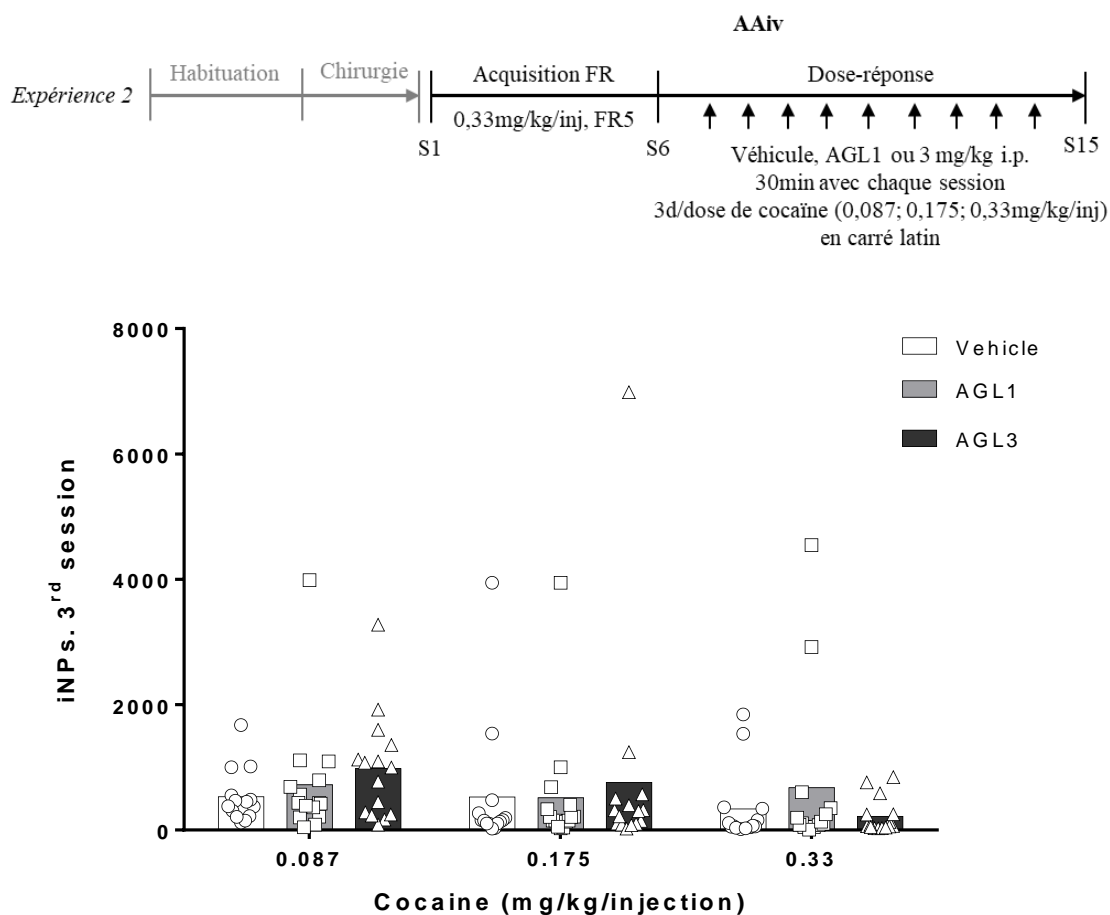


Figure A1 : Effet de l'AGL sur les iNP pendant les expériences de dose-réponses en FR. L'AGL à 1 ou 3 mg/kg, i.p. ne modifie pas le comportement de recherche de cocaïne dans les orifices inactifs (iNP) en planning de renforcement FR pour aucune des doses de cocaïne ($F_{(4,82)} = 0,650$, $p = 0,629$). Véhicule (DMSO 1,5%, $n = 14$), AGL1 ($n = 15$) et AGL3 ($n = 15$). Two-way mixed ANOVA

Annexe 2

Résultat supplémentaire de l'expérience 3 (Article I) et présentent le nombre de NP inactifs lors du traitement par l'AGL dans le protocole d'AAiv de cocaïne (PR) :

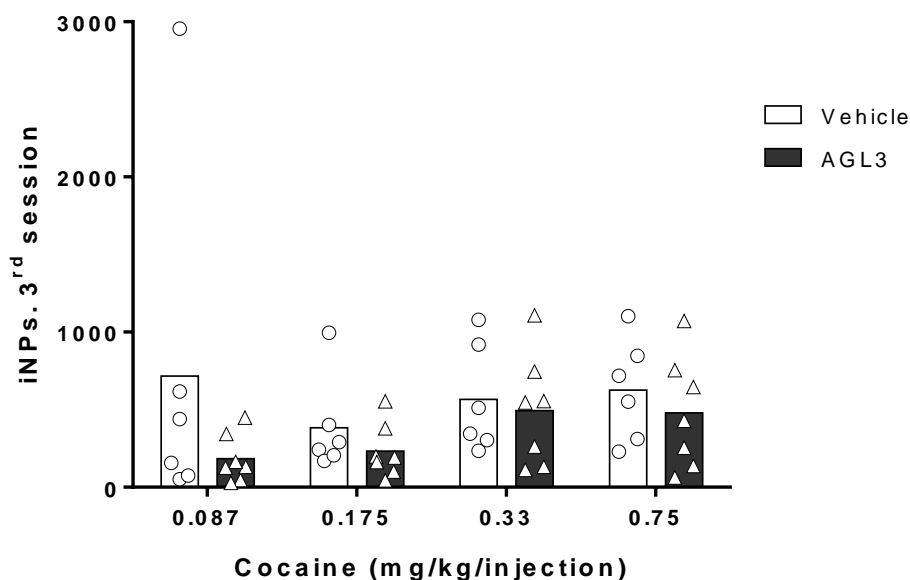
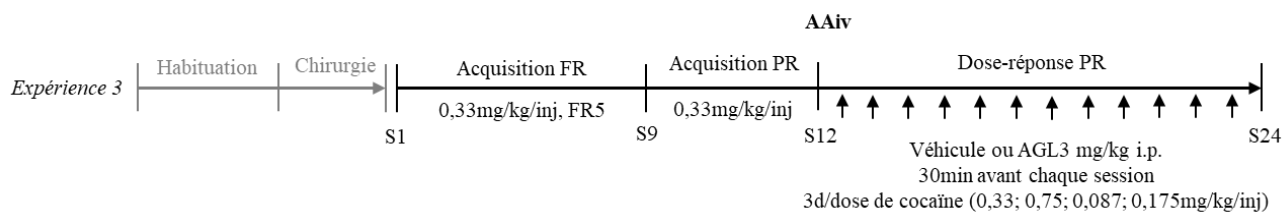


Figure A2 : Effet de l'AGL sur les iNP pendant les expériences de dose-réponses en PR. L'AGL à 3 mg/kg, i.p. ne modifie pas le comportement de recherche de cocaïne dans les orifices inactifs (iNP) en planning de renforcement PR pour aucune des doses de cocaïne ($F_{(1,3,14,28)} = 0,794$, $p = 0,420$). *Vehicle* (DMSO 1,5%, $n = 6$) et *AGL3* ($n = 7$). *Two-way mixed ANOVA*

Annexe 3

Analyses qPCR supplémentaires de l'expérience 6 (Article II) et présentent l'expression relative de gènes d'intérêts pendant la période de reconsolidation (30 min après la réactivation des indices associés à la cocaïne) :

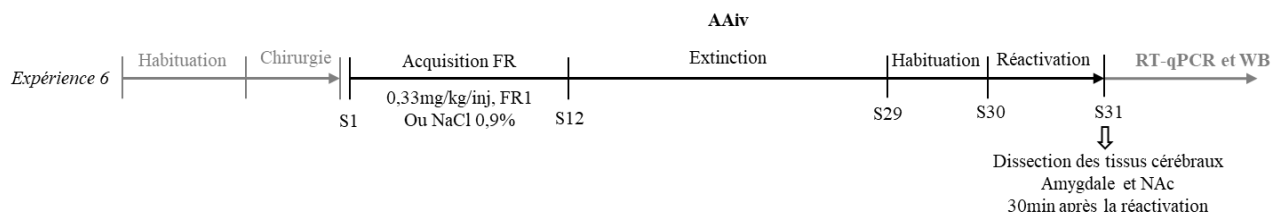
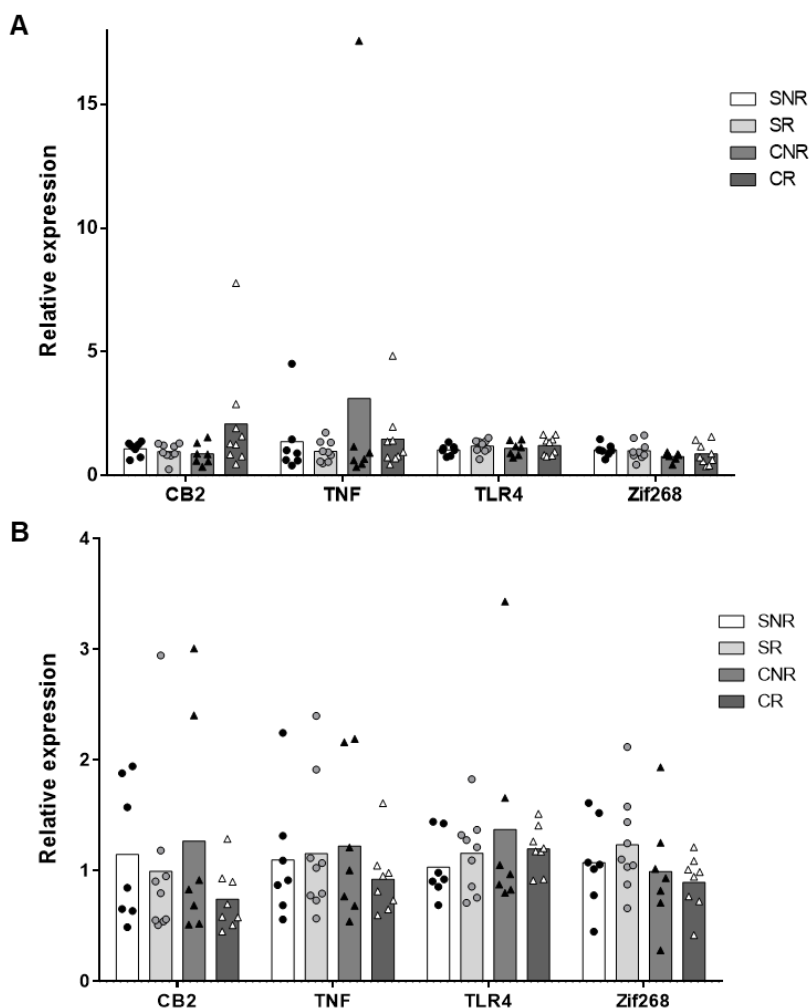


Figure A3 : Quantification supplémentaire des ARNm pendant la période de reconsolidation de la mémoire des indices associés à la cocaïne. Quantification dans l'amygdale (A) et du NAc (B). Seule une tendance à l'interaction cocaïne x réactivation est trouvée pour le CB2 dans l'amygdale ($F_{(1,28)} = 3,5463$ $p = 0,07011$). $Relative\ expression = 2^{\Delta\Delta Cq}$. Saline non-réactivation (SNR) $n=7$, saline réactivation (SR) $n=9$, cocaïne non-réactivation (CNR) $n=8$ et cocaïne réactivation (CR) $n=9$. CB2 : cannabinoid receptor 2, TLR4 : toll-like receptor 4, TNF : tumor necrosis factor, ZIF268 : zinc finger protein 268. Two-way ANOVA



Annexe 4

Ces résultats correspondent à l'expérience 7, qui nous permet de tester chez des rats naïfs, l'effet de l'inhibiteur du NFκB sur le comportement d'anxiété :

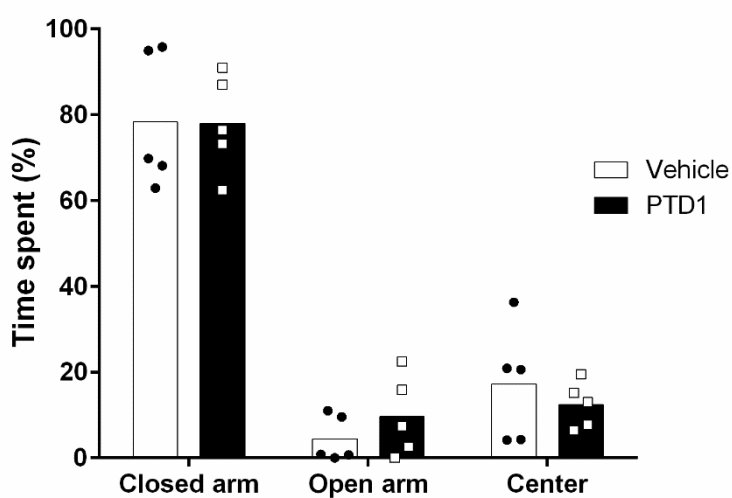
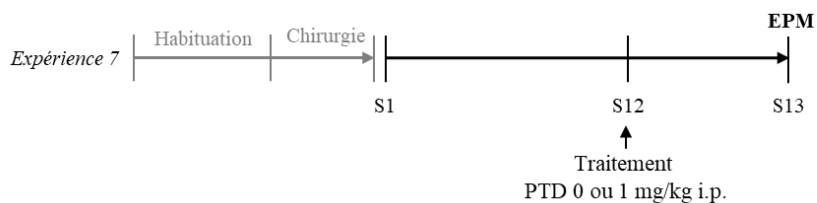


Figure A4 : Effet du PTD sur un indice d'anxiété. Le PTD à 1 mg/kg n'induit pas de modification de l'état d'anxiété de l'animal. Les animaux contrôles et traités au PTD ne montrent pas de différence ($F_{(1,8)} < 0,001$, $p = 1$). Il n'y a pas non plus d'interaction traitement x compartiment ($F_{(2,16)} = 0.362$, $p = 0.702$) quel que soit le paramètre mesuré (pourcentage de temps passé, dans les bras fermés, ouverts et au centre du labyrinthe en croix surélevé). *Vehicle (DMSO1,5%, n=5), PTD1 (n=5). Two-way mixed ANOVA*

Annexe 5

Ces résultats correspondent à l'expérience 8, qui consistait à évaluer l'effet de l'inhibiteur du NFκB (PTD) sur l'activité locomotrice :

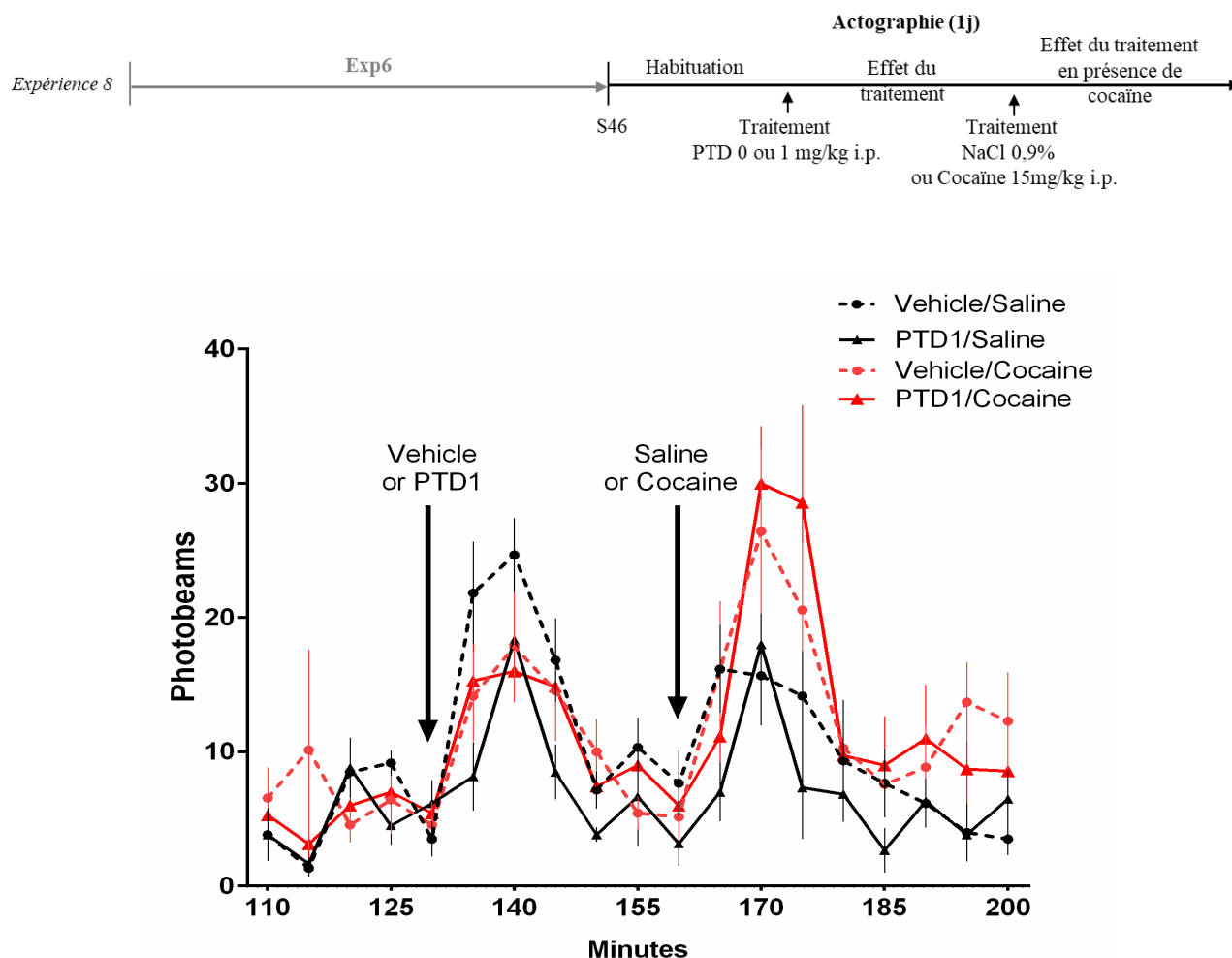


Figure A5 : Effet du PTD sur l'activité locomotrice spontanée et l'hyperlocomotion induite par la cocaïne. Effet du PTD sur le nombre de passages (photobeams) enregistrés entre les deux faisceaux infrarouges des cages d'actographie. Habituation : 110-120 min pas d'interaction traitement x cocaïne x temps ($F_{(2,44)} = 0,790$, $p = 0,460$) ni aucun autre effet significatif. Effet du PTD seul : 120-130 min pas d'interaction traitement x cocaïne x temps ($F_{(2,44)} = 0,645$, $p = 0,530$), seul un effet du temps est trouvé significatif ($F_{(2,44)} = 24,540$, $p < 0,001$) indiquant une augmentation de la locomotion induite par la piqure i.p.. Effet du PTD sur la locomotion induite par la cocaïne : 170-180 min pas d'interaction traitement x cocaïne x temps ($F_{(2,44)} = 1,049$, $p = 0,359$), en revanche, des effets significatifs du temps ($F_{(2,44)} = 13,344$, $p < 0,001$) et de l'injection ($F_{(1,22)} = 7,410$, $p = 0,012$) de cocaïne sont retrouvés sans qu'aucun effet de traitement soit mesuré ($F_{(1,22)} = 0,040$, $p = 0,843$) indiquant une hyperlocomotion induite par la cocaïne sans que le PTD n'ait d'effet ni sur la locomotion basale ni sur l'hyperlocomotion induite par la cocaïne. *Vehicle/Saline* ($n=6$), *PTD1/Saline* ($n=6$), *Vehicle/cocaine* ($n=7$) et *PTD1/Cocaine* ($n=7$). *Three-way mixed ANOVA*

Annexe 6

Ces résultats correspondent à l'expérience 9, qui consistait à évaluer l'effet de l'inhibiteur du NFκB (AGL) sur l'activité locomotrice :

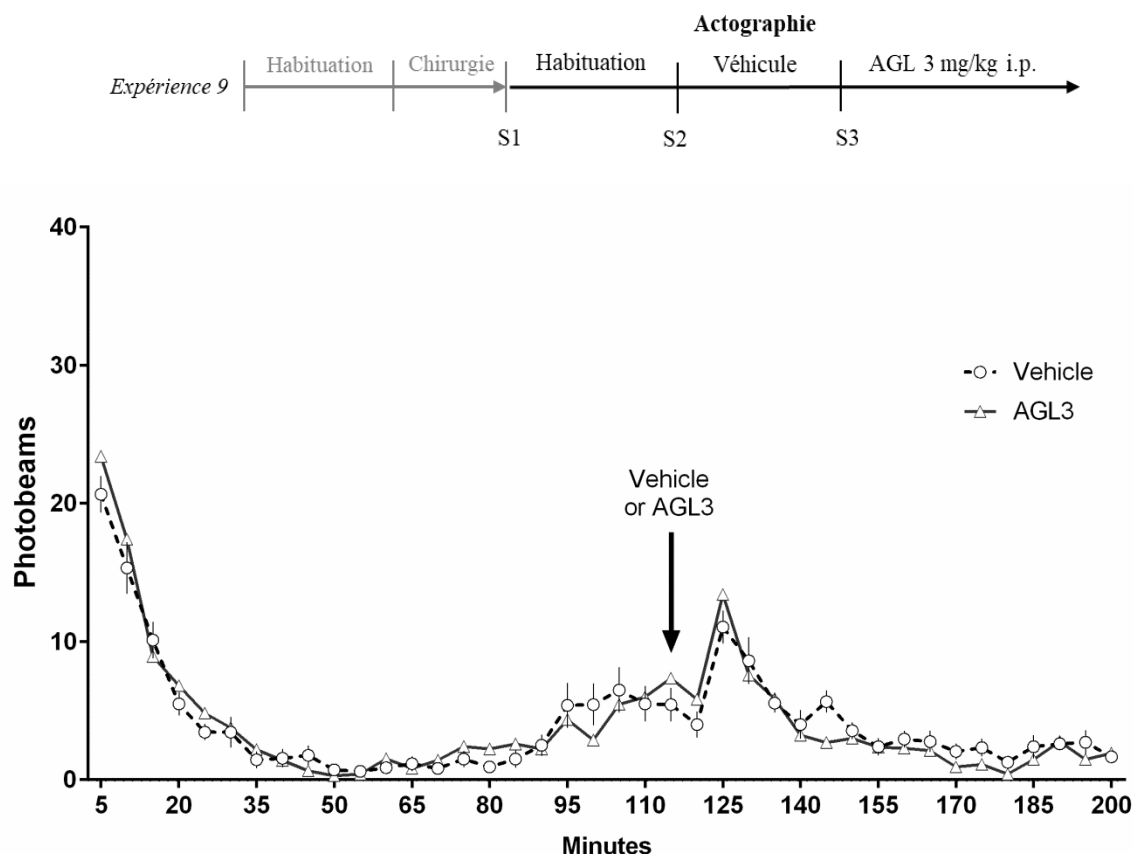


Figure A6 : Effet de l'AGL sur l'activité locomotrice spontanée. Effet de l'AGL sur le nombre de passages (photobeams) enregistrés entre les deux faisceaux infrarouges des cages d'actographie. Habituation : 40-60 min pas d'interaction traitement x temps ($F_{(2,36,37.70)} = 1,016, p = 0,382$) ni aucun autre effet significatif. Effet de l'AGL : 120-130 min pas d'interaction traitement x temps ($F_{(2,32)} = 0,909, p = 0,413$), seul un effet du temps est trouvé significatif ($F_{(2,32)} = 12,443, p < 0,001$) indiquant une augmentation de la locomotion induite par la pique. Un traitement à l'AGL 3 mg/kg i.p. ne modifie pas la locomotion basale des rats. *Vehicle* (DMSO 1,5%, $n=15$) et *AGL3* ($n=15$). ANOVA à mesure répétées

Annexe 7

Ces résultats correspondent aux expériences 10 et 11 qui évaluaient l'effet de l'inhibiteur du NFκB sur la consommation de cocaïne et l'extinction instrumentale associée :

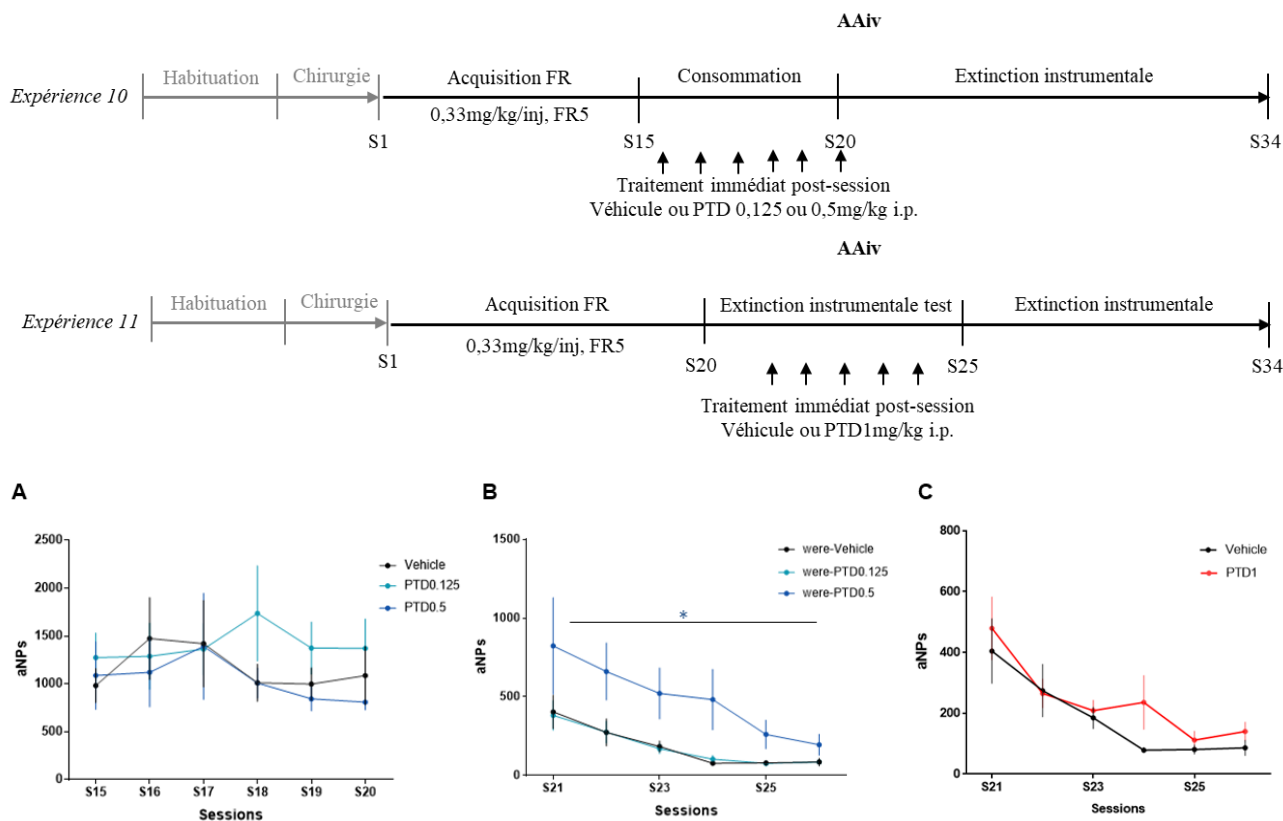


Figure A7 : Effet du PTD sur la consommation de cocaïne et l'extinction instrumentale. (A) L'administration de PTD après les sessions d'AAiv ne modifie pas la consommation de cocaïne (vehicle *versus* PTD0.5 $t_{(100.14)} = -0,456$, $p = 0,6496$; vehicle *versus* PTD0.125 $t_{(100.31)} = 0,617$, $p = 0,5388$). (B) Les rats préalablement traités au PTD à 0,5 mg/kg pendant la consommation montrent un retard de leur extinction instrumentale avec un effet traitement significatif ($t_{(109.221)} = 2,634$, $p = 0,009$) ainsi qu'une interaction traitement x temps significative ($t_{(104.947)} = -2,205$, $p = 0,029$). L'administration de PTD à 1 mg/kg après les sessions d'extinction instrumentale ne modifie pas l'extinction des rats ($t_{(70)} = 0,235$, $p = 0,815$) (C). aNPs : nose-pokes dans l'orifice actif, vehicle (DMSO1,5%, $n = 7$), PTD0.125 ($n=7$), PTD0.5 ($n=7$) et PTD1 ($n=7$). Modèle linéaire mixte

Discussion

La dépendance à la cocaïne est une pathologie complexe qui, malgré de nombreuses décennies de recherche, n'est pas encore totalement comprise. Le très large spectre de processus et mécanismes moléculaires et cellulaires altérés par la consommation de cocaïne explique en grande partie la difficulté à décrire cette pathologie. Récemment, une implication inflammatoire et neuroinflammatoire dans la dépendance à la cocaïne a été suggérée. Parmi les voies impliquées dans ces mécanismes, celle du NFκB semble particulièrement intéressante.

Dans la première partie de ce travail, nous avons voulu étudier l'implication de cette voie dans un modèle de consommation volontaire de cocaïne chez le Rat. Pour cela, nous avons mesuré un indice d'activation de ce facteur au niveau de plusieurs structures cérébrales impliquées dans le circuit de la récompense après un mois de consommation volontaire de cocaïne. Nous avons ensuite étudié la portée comportementale de l'implication de cette voie dans la consommation de cocaïne. Pour cela, nous avons mesuré l'effet de l'inhibition pharmacologique de la voie du NFκB sur la consommation ainsi que sur la motivation pour plusieurs doses de cocaïne.

Dans la deuxième partie de ce travail, connaissant les multiples fonctions du NFκB, nous avons voulu étudier l'implication de ce facteur dans la rechute à la cocaïne. Du fait que les épisodes de rechute impliquent particulièrement la mémoire associée à la cocaïne, nous avons mesuré l'effet de l'inhibition pharmacologique de la voie du NFκB après la réactivation des souvenirs liés aux indices associés à la cocaïne, sur le comportement de recherche de cocaïne.

1. Le rôle de NFκB dans la consommation de cocaïne

1.1 La consommation volontaire de cocaïne augmente l'activation du NFκB dans le striatum

Plusieurs études nous laissent envisager l'implication du NFκB dans la consommation de cocaïne. Ces différentes études ont montré, de manière directe ou indirecte (voie associée), une mise en jeu du NFκB dans la consommation de cocaïne (voir table 2, Correia et al., 2020). De manière directe, Ang et coll. (2001), tout comme Russo et coll. (2009), ont montré une augmentation de l'expression des sous-unités NFκBp65 et p105 dans le NAc de souris traités à la cocaïne de manière répétée. L'augmentation de l'expression des sous-unités du NFκB s'accompagne d'une augmentation de l'activation de ce facteur notamment de la forme p-NFκBp65 dans le NAc de souris soumises à une

CPP de cocaïne (Zhu et al., 2018b). De manière indirecte, plusieurs études ont montré des augmentations d'expression de facteurs de la voie du NF κ B ou de ses gènes cibles. Notamment, Periyasamy et coll. (2018) ont montré une augmentation des niveaux protéiques de TLR4, TRAF6, IRAK, MyD88, TNF α , IL-1 β ou encore IL-6 dans le striatum de souris soumises à une CPP de cocaïne.

Pour nos expériences d'immunohistofluorescence, nous avons choisi de mesurer une marque de phosphorylation de la sous-unité NF κ Bp65. Les modifications post-traductionnelles ne sont possibles qu'une fois la voie du facteur stimulée et celui-ci libéré de l'I κ B. Aussi ces modifications sont essentielles à l'activation du facteur, sa translocation au noyau ainsi que son activité transcriptionnelle (Wan and Lenardo, 2009). Parmi ces modifications, la phosphorylation de la serine 536 est une marque d'activation précoce du facteur car elle est réalisée dans le cytoplasme et permet donc de mesurer les p-NF κ Bp65 péri-nucléaires et nucléaires (Moreno et al., 2010). Bien qu'une étude récente a montré que la phosphorylation au niveau de la sérine 536 était associée à une diminution de la stabilité de la sous-unité NF κ Bp65, celle-ci n'induisait pas une diminution importante de la quantité totale (Hatanaka et al., 2019). Nos résultats d'immunohistofluorescence sont en accord avec les études précédentes et démontrent une augmentation de p-NF κ Bp65 dans le NAc, ainsi qu'une tendance dans le striatum dorsal, chez des rats soumis à un mois d'AAiv de cocaïne. Ce résultat est important car il s'agit de la seule étude mesurant les niveaux du NF κ B dans le cadre d'un protocole de consommation volontaire de cocaïne.

La plupart des études qui se sont intéressées au NF κ B (Ang et al., 2001; Russo et al., 2009; Zhu et al., 2018b) montrent des modulations de ce facteur au niveau du striatum. A l'heure actuelle, il est impossible de savoir si ces auteurs ne s'étaient intéressés uniquement à cette structure ou s'ils avaient analysé d'autres structures sans y voir de différences. Dans le cadre de mon travail, nous avons entrepris de quantifier l'activation du NF κ B dans plusieurs structures cérébrales impliquées dans le système de la récompense. Nos résultats montrent une augmentation de p-NF κ Bp65 seulement pour les deux sous-régions du NAc, ainsi qu'une tendance pour le DMS, et reproduisent ainsi les résultats de la littérature. En revanche, dans les autres structures cérébrales analysées, nous n'avons pas observé de différence de niveau de phosphorylation de la sous-unité NF κ Bp65 entre les conditions expérimentales.

Tout d'abord, le NF κ B étant ubiquitaire, il est possible que même si on ne voit pas d'effet global, l'activation du NF κ B soit différente entre les différents types cellulaires. Il serait intéressant d'effectuer une immunohistofluorescence afin de quantifier l'activation du facteur au sein des différents types cellulaires par le biais de co-marquage Iba1 (microglie) et NeuN (neurone).

L'effet structure-spécifique observé peut s'expliquer par la potentialisation de la neurotransmission dopaminergique induite par la cocaïne dans le NAc (Di Chiara and Imperato, 1988; Ritz et al., 1987) et la stimulation des récepteurs dopaminergiques. Plusieurs études ont effectivement montré que la stimulation des récepteurs D1 (Han et al., 2007; Lepsch et al., 2009) et D2 (Takeuchi and Fukunaga, 2003; Xie et al., 2007) induisait l'activation du NFκB.

1.2 L'inhibition du NFκB augmente la consommation de cocaïne

Après avoir observé que la consommation volontaire de cocaïne induisait une augmentation de la forme phosphorylée de NFκBp65 et donc une augmentation possible de son activation, nous avons voulu mesurer quelle pouvait être l'implication de ce facteur dans le comportement de consommation de cocaïne. Pour cela, l'AGL, un agent pharmacologique connu pour inhiber l'activation du NFκB ou sa fixation à l'ADN (Xia et al., 2004) a été utilisé. Nous avons choisi d'administrer l'AGL 30 min avant les sessions d'AAiv afin que le NFκB soit inhibé dès le début de la session. Deux paradigmes expérimentaux ont été utilisés, le FR et le PR. Ces deux types de programme de renforcement permettent de mesurer des indicateurs différents. Le paradigme en FR permet de mesurer le comportement de consommation, alors que celui en PR permet de mesurer la quantité d'effort que l'animal est disposé à fournir pour une seule injection, révélant ainsi la motivation de l'animal pour la cocaïne (Richardson and Roberts, 1996).

Nos expériences ont montré que l'inhibition de la voie du NFκB par l'AGL à 3 mg/kg induit une augmentation des effets renforçateurs de la cocaïne ainsi qu'une augmentation de la motivation pour l'obtention de la cocaïne. De manière intéressante, ces deux effets ont été observés seulement pour une dose de cocaïne. Ceci souligne l'intérêt des expériences mesurant l'effet d'une substance à différentes doses de cocaïne. En effet, l'utilisation d'une seule dose de cocaïne peut entraîner une mauvaise interprétation des résultats. Si nous avions, par exemple, réalisé l'ensemble de nos expériences à 0,33 mg/kg/injection, nous n'aurions visualisé aucun effet de l'administration de l'AGL. De plus, dans leur étude, Zhu et coll. (2018b) concluent que l'inhibition de TLR3 au niveau du NAc prévenait l'activation du NFκB et induisait une diminution des propriétés renforçatrices de la cocaïne en AAiv. Ces résultats, en contradiction apparente avec nos résultats, peuvent s'expliquer par l'utilisation d'une forte dose de cocaïne (0,75 mg/kg/injection). Dans ce cas, une diminution du comportement de consommation peut également s'expliquer par une augmentation des propriétés renforçantes et un décalage de la courbe dose-réponse vers la gauche telle que nous le suggérons.

Cette idée est également soutenue par les résultats que nous avons obtenus dans une expérience préliminaire annexe mesurant l'effet du PTD, un autre inhibiteur de la voie du NFκB, sur la consom-

tion de cocaïne à 0,33 mg/kg/injection. Dans cette expérience, nous avons pu observer que le PTD n'avait pas d'effet sur le comportement de consommation de cocaïne. En revanche, de manière intéressante, une fois le traitement terminé et les rats passés en extinction instrumentale, nous avons pu observer un léger retard de l'extinction chez les rats préalablement traités au PTD à 0,5 mg/kg. Ce retard peut s'expliquer entre autres, par une augmentation des propriétés renforçatrices de la cocaïne non visible à 0,33 mg/kg/injection.

Par ailleurs, le fait que l'augmentation du comportement ne soit pas observée pour toutes les doses de cocaïne nous permet de réfuter un possible effet hyperlocomoteur de l'AGL. De plus, une analyse de la locomotion, nous a permis de conclure à une absence de modification de la locomotion basale par l'AGL à 3 mg/kg. Enfin, l'analyse de l'activité de recherche dans les orifices inactifs (iNP) ne montre aucune différence entre les groupes de traitement, soulignant d'autant plus l'absence d'un effet non-spécifique.

1.3 Par quels mécanismes le NFκB limite-il la consommation de cocaïne ?

De manière générale, nos résultats comportementaux soutiennent l'hypothèse que le NFκB jouerait un rôle dans la limitation des comportements associés à la consommation de cocaïne. Parmi les mécanismes, il est possible que cet effet résulte d'une fonction diminuée des D2R. En effet, un résultat similaire a été observé dans des expériences ciblant ce récepteur. Dans leur étude, Chen et coll. (2018) ont montré que l'inhibition spécifique du D2R dans le NAc augmentait le comportement de consommation de cocaïne en AAiv seulement pour les doses les plus faibles de cocaïne (0,02 – 0,07 mg/kg/injection i.v.). En revanche, le comportement de ces souris était inchangé pour des doses plus fortes (0,14 – 0,56 mg/kg/injection i.v.). De manière intéressante, ces mêmes auteurs ont montré qu'une inhibition spécifique du D2R dans la VTA augmentait le comportement de consommation de cocaïne en AAiv pour toutes les doses de cocaïne testées. De nombreuses études ont montré une interconnexion des récepteurs D2 et du NFκB. Le NFκB semble impliqué dans la régulation des taux normaux de D2R au niveau du striatum car les souris NFκBp50-KO présentent un niveau de D2R diminué (Xie et al., 2007). D'autre part, l'activation des D2R induit une augmentation de l'activité transcriptionnelle du NFκB mesurée, par le biais d'un gène rapporteur, en culture cellulaire (Takeuchi and Fukunaga, 2003). Ces données nous permettent de supposer que l'augmentation de p-NFκBp65 mesurée au niveau du NAc après une consommation volontaire de cocaïne est en partie due à la stimulation des récepteurs D2. L'activation du NFκB permettant *in fine* l'augmentation les taux de D2R striataux, jouerait comme un frein à la consommation. En effet, les taux de D2R du striatum et de la VTA sont inversement corrélés à la vulnérabilité à développer une dépendance

(Baik, 2013; Bello et al., 2011). Par ailleurs, dans nos résultats, le fait que l'augmentation de la consommation de cocaïne ne soit pas visible à toutes les doses testées, nous laisse suggérer que les D2R de la VTA ne sont pas impliqués (Chen et al., 2018).

De plus, nos expériences en PR, nous montre que l'inhibition du NF κ B augmente la motivation des rats pour les fortes doses de cocaïne. Une nouvelle fois, une implication des D2R peut expliquer ce résultat. En effet, Bock et coll. (2013) ont montré que l'inhibition des D2R dans le NAc augmentait la consommation des souris en AAiv (1-2mg/kg, i.v.) mais également la motivation de celles-ci pour l'obtention de la drogue. Ces auteurs suggèrent que l'augmentation de la potentialisation excitatrice des afférences glutamatergiques mesurée sur les D2R du NAc serait un mécanisme de protection freinant la consommation. Ce résultat peut également s'expliquer par la mise en jeu des récepteurs TLR4. En effet, dans leur étude Tanda et coll. (2016) ont montré que l'inhibition pharmacologique du TLR4 par l'administration systémique de (+)-naltrexone augmente la libération de dopamine induite par la cocaïne dans le NAc, mais seulement pour une forte dose de cocaïne (1 mg/kg, i.v.). On peut donc supposer que l'inhibition de la voie TLR4/NF κ B potentialise la libération de dopamine dans le NAc. Du fait que la dopamine dans le NAc soit connue pour avoir un rôle primordial dans la motivation (Depoortere et al., 1993), on peut supposer que l'inhibition de cette voie potentialise la motivation des rats pour de fortes doses de cocaïne (0,75 mg/kg/injection i.v.).

Cette dichotomie d'interprétation des effets comportementaux observés entre les programmes de renforcement FR ou PR peut s'expliquer par un effet de la dose de cocaïne ou par les structures cérébrales mises en jeux dans ces différents types de comportement. Ainsi, il se peut que la mise en jeu d'une voie plutôt qu'une autre dépende de la dose de cocaïne. Des études ont effectivement montré que la cocaïne pouvait activer des voies différentes selon sa dose (Guha et al., 2016; Xu et al., 2013). Dans ces études, des faibles doses de cocaïne activent une voie menant à la stimulation du facteur CREB, alors qu'elle active une voie menant à la stimulation du facteur p53 pour de fortes doses. On peut supposer ici que de la même manière, la cocaïne active la voie du D2R pour de faibles doses alors qu'elle active la voie du TLR4 pour des doses plus élevées.

Nos résultats suggèrent que le NF κ B joue un rôle de régulateur homéostatique limitant la consommation de cocaïne. Ce rôle pourrait également avoir pour but final de protéger les tissus cérébraux en condition de consommation. En effet, le NF κ B a été associé *in vitro* à la protection cellulaire contre l'apoptose induite par la cocaïne, médiée par la stimulation des récepteurs D1 (Lepsch et al., 2009). Certains auteurs ont proposé que la mort cellulaire par apoptose induite par la cocaïne pouvait résulter de l'apparition d'un stress oxydatif notamment au niveau du striatum et du PFC (Crawford et al., 2006; Poon et al., 2007). Ces expériences, réalisées en culture cellulaire, ont montré que suite à une

exposition à la cocaïne, l'expression des gènes impliqués dans la neuroinflammation, dont le NFκB, était augmentée 24 h après, le stress oxydatif était lui augmenté à 48 h, et la mort cellulaire était observée à 72 h. Dans un autre étude chez le rat, Dietrich et coll. (2005) ont montré que des injections chroniques de cocaïne (20 mg/kg, i.p.) n'induisaient pas d'apoptose, ni au niveau du striatum ni du PFC. En revanche, ces auteurs décrivent une augmentation des radicaux libres mais également, 24 h après la dernière injection, des enzymes anti-oxydantes (superoxyde dismutase, SOD, et glutathion peroxydase). Ces auteurs proposent que chez le rat, un mécanisme compensatoire, impliquant des processus antioxydants, se mettrait en place pour contrecarrer l'apoptose induite par la cocaïne. Par ailleurs, il est intéressant de noter le délai d'action de ces intervenants. En effet, il est connu que le NFκB régule l'expression de la SOD (Rojo et al., 2004), ainsi que plusieurs enzymes impliquées dans la synthèse du glutathion (Yang et al., 2001).

De manière intéressante, dans les expériences d'immunohistofluorescence, une tendance à l'interaction avec le délai de mise à mort a été observée. Il semble que l'augmentation du p-NFκBp65, chez les rats aillant consommés de la cocaïne, soit majoritairement soutenue par les valeurs de quantifications 22 h après la dernière consommation. Les études précédentes montrant l'implication du NFκB, ont mesuré les taux des sous-unités de NFκB et p-NFκBp65 dans le NAc 4 h (Ang et al., 2001; Russo et al., 2009) et 24 h (Zhu et al., 2018b) après la dernière injection. Des études en cultures cellulaires ont également mesuré un pic d'action du NFκB 24 h après l'exposition à la cocaïne (Crawford et al., 2006). Le fait qu'une augmentation de la forme activée du NFκB soit observée 22 h après la dernière consommation de cocaïne suggère une activation cumulative ou retardée. L'augmentation de l'activation du NFκB représenterait un processus persistant d'adaptation à la consommation de cocaïne.

L'observation de ce délai d'activation du NFκB peut s'expliquer par une implication du NFκB dans les mécanismes de protection contre le stress oxydatif induisant la mort cellulaire induit par la cocaïne (détaillée précédemment) ou une implication du facteur dans les processus mnésiques associés à la consommation de cocaïne. En effet, le NFκB a un rôle important dans les processus de plasticité synaptique et de LTP (Salles et al., 2014). Ryan et coll. (2012) ont démontré par le biais d'une analyse « ingenuity pathway analysis » sur des extraits cellulaires 5 h et 24 h après l'induction d'une LTP dans des hippocampes de rat, une expression différentielle de gènes induit par la phase retardée de la LTP (« late-LTP »). Leur analyse a démontré que la LTP induisait à 5 h une augmentation de l'expression de gènes associés à des récepteurs couplés aux protéines G, au processus de dendritogénèse ou encore de neurogénèse, et à 24 h, une augmentation des gènes associés à la voie de signalisation neurotrophine/NFκB. L'augmentation que nous mesurons à 22 h peut donc résulter de

l'implication du NFκB dans ce processus de LTP. Par ailleurs, l'idée que le NFκB serait impliqué dans la LTP seulement 24 h semble en partie contradictoire avec l'observation que les cytokines, dont IL-1β, qui sont régulées par ce facteur, soient nécessaires à la maintenance de la LTP et ce dès 1 h après l'induction (Schneider et al., 1998). Ainsi, on peut proposer que le NFκB soit nécessaire à la fois dans une phase précoce, immédiate, et dans une phase retardée. Un profil similaire est retrouvé avec un inhibiteur de la synthèse protéique (Grecksch and Matthies, 1980). De plus, l'action réciproque d'IL-1β stimulant lui-même l'activation du NFκB pourrait également contribuer à l'effet d'accumulation mesuré ici.

2. Le rôle de NFκB dans la rechute associée à la cocaïne

2.1 Validation de notre protocole expérimental

Dans la deuxième partie de mon travail de thèse, nous nous sommes donc intéressés au rôle potentiel du NFκB dans la reconsolidation des souvenirs liés aux indices préalablement associés à la cocaïne. Afin de réaliser cette partie du projet, un protocole d'AAiv pour l'étude de la reconsolidation des indices a été mis au point. Ce protocole a été développé suite à l'analyse de nombreuses études publiées sur le thème de la reconsolidation associées à la cocaïne et utilisant le modèle de l'AAiv. Ainsi, il est rapidement ressorti que toutes ces études utilisaient le même plan expérimental que nous avons ensuite adapté à nos chambres opérantes.

Notre protocole de réactivation a d'abord été validé par l'utilisation de cycloheximide, un inhibiteur de la synthèse protéique, afin de s'assurer que nous avons bien induit une reconsolidation des indices. Dès 1968, la consolidation est décrite comme étant un mécanisme dépendant de la synthèse protéique (Barondes and Cohen, 1968). Plus tard en 2000, Nader et coll. confirment, par l'utilisation d'un protocole de conditionnement de peur, que la synthèse protéique est nécessaire à la consolidation et à la reconsolidation des indices associées à un choc électrique. Dans leur expérience de consolidation, l'administration systémique d'anisomycine jusqu'à 3 h après l'association son/choc électrique prévient le comportement de peur (immobilisation) à la présentation du son 24 h plus tard. Ils ont ensuite appliqué leur expérience à la reconsolidation et démontré, chez des rats ayant préalablement acquis le comportement d'immobilisation induit par le son associé à un choc électrique, qu'une administration d'anisomycine après un rappel bref éliminait ce comportement 24 h plus tard (Nader et al., 2000).

Plusieurs études ont ensuite reproduit ces résultats dans la reconsolidation associée à la cocaïne et montré que l'inhibition systémique ou intra-BLA de la synthèse protéique altérait la reconsolidation associée au contexte (Fuchs et al., 2009; Wells et al., 2011; Zhu et al., 2018a), ainsi qu'aux indices (Dunbar and Taylor, 2016; Sorg et al., 2015). Dans leur étude, Dunbar et Taylor (2016) ont ainsi démontré que l'injection de CHX à 2,2 mg/kg i.p. administré après une réexposition aux indices diminue significativement le comportement de recherche de la cocaïne (réinstallation) induite par les indices 48 h plus tard. Les auteurs relèvent que cet effet est dose-dépendent (aucun effet observé à 1 mg/kg i.p.) et réactivation-dépendent. L'injection de CHX à 2,2mg/kg i.p. altère bien la reconsolidation des indices associés à la cocaïne (Dunbar and Taylor, 2016). Nous avons ainsi validé notre protocole par l'utilisation de CHX à 2,2 mg/kg i.p. La réinstallation plus faible de nos rats confirme que notre protocole a bien déclenché une phase de reconsolidation pendant laquelle la CHX a eu un effet.

2.2 Les inhibiteurs du NFκB altèrent la mémoire liée aux indices associés à la cocaïne

Par la suite, nous avons démontré que l'injection systémique de deux inhibiteurs de la voie du NFκB, après une réactivation des indices associés à la cocaïne, réduisait significativement le comportement de recherche de cocaïne induit par la présentation des indices 24 h plus tard. L'inhibition de la voie du NFκB a pu altérer le mécanisme de reconsolidation des indices entraînant un affaiblissement de l'association indices/cocaïne. En effet, la réinstallation induite par les indices se base sur l'idée que la présentation des indices devenus des prédicteurs de la disponibilité de la drogue va activer des voies majoritairement soutenues par les projections dopaminergiques et glutaminergiques allant de la VTA vers la BLA, le mPFC et le NAc (Feltenstein and See, 2008; Shaham et al., 2003), qui induisent la recherche de cocaïne. Si le souvenir associant les indices aux effets pharmacologiques de la cocaïne est altéré, de par un affaiblissement de la reconsolidation, alors la présentation des indices stimule moins ces voies ainsi que la recherche qui en découle. Dans notre cas, on peut supposer que l'inhibition du NFκB ait pu prévenir les mécanismes actifs de restockage de cette mémoire associative entre les indices et la cocaïne rendue labile par la réactivation. Notamment, l'inhibition du NFκB a pu altérer les mécanismes de plasticité et de potentialisation synaptique (Albensi and Mattson, 2000). Ces processus de plasticité qui sont nécessaires pour la re-maturation des synapses formées par et associées à la cocaïne redevenues silencieuse par la réactivation de la mémoire associées aux indices et qui sont impliquées *in fine* dans le comportement de recherche de cocaïne (Wright et al. 2020).

Par ailleurs, à ce stade il est possible d'envisager que la réinstallation plus faible observée chez les animaux traités à l'AGL ou au PTD soit indépendante de la réactivation et reconsolidation des in-

lices. En effet, nous savons que la réactivation déclenche bien une phase de reconsolidation des indices mais, à l'heure actuelle, nous ne savons pas si l'effet de l'AGL ou du PTD résulte bien d'une action de ces agents pendant la reconsolidation. On peut, par exemple, supposer que ces agents pharmacologiques ont agi sur les adaptations induites par le sevrage. En effet, Freeman et coll. (2010) ont montré que l'expression du GFAP, marqueur astrocytaire, est augmentée après 10 jours d'abstinence forcée alors qu'il était inchangé après 24 h. Pour cela, une expérience contrôle supplémentaire est nécessaire afin de mesurer l'effet de l'administration de ces agents dans les mêmes conditions mais sans la réactivation/présentation des indices et donc sans reconsolidation. Cette expérience actuellement en cours complètera les expériences de l'article II (en écriture) et nous permettra de conclure sur l'effet de ces agents sur la reconsolidation.

Nos données préliminaires présentées en annexe, nous permettent de ne pas considérer que les résultats obtenus en terme de diminution du comportement de recherche de cocaïne soient dus à un impact du PTD sur l'anxiété ou l'activité locomotrice ni de l'AGL sur la locomotion.

Par ailleurs, nos résultats pharmacologiques ont mis en lumière un effet dose-dépendant pour le PTD, puisque seuls les animaux ayant reçu les doses les plus faibles montrent une diminution significative de leur recherche de cocaïne. Cet effet peut s'expliquer par une action de l'agent pharmacologique sur d'autres voies. En effet, l'action principale du PTD est l'inhibition directe ou indirecte du NF κ B, mais de nombreuses autres cibles moléculaires ont été identifiées. Parmi celles-ci on retrouve notamment les histones désacétylases (HDAC, Gopal et al., 2007). De manière intéressante, une étude récente a démontré que l'inhibition de l'activité HDAC au niveau de l'hippocampe dorsal augmentait la reconsolidation d'une mémoire spatiale en Morris water maze chez la souris (Villain et al., 2016). Ainsi, l'absence d'effet du traitement PTD 3 mg/kg i.p. pourrait s'expliquer par une inhibition de l'activation des HDAC. Par ailleurs, si l'on regarde de plus près les résultats comportementaux de ce groupe, il semble y avoir deux sous-populations : une qui présente une pente de réinstallation importante du même ordre que les animaux contrôles voire plus importante, et une autre qui semble avoir une pente de réinstallation nulle. Malheureusement, le petit effectif de ce groupe ne permet pas, à l'heure actuelle, de confirmer ou infirmer statistiquement cette observation.

Il est d'autant plus intéressant de souligner l'effet dose-dépendant du PTD si on s'inscrit dans le contexte de la théorie de l'intégration des souvenirs (Gisquet-Verrier and Riccio, 2018). Cette théorie défend l'idée que l'état interne de l'animal, au même titre que les signaux environnementaux, est intégré dans la mémoire. Ainsi, ces auteurs remettent en question plusieurs études de la littérature soulignant que les altérations observées dans des procédures de consolidation ou reconsolidation

pouvaient s'expliquer par un défaut dans le rappel plus que dans le stockage (consolidation/reconsolidation). En 2015, ils publient une étude dans laquelle le déficit mnésique induit par une administration de CHX après l'apprentissage ou la réactivation d'une tâche d'évitement passif induit par un choc électrique est bloqué par une injection de CHX 30 min avant le test de rétention (Gisquet-Verrier et al., 2015).

Dans le cas de ce travail, cela impliquerait qu'un contrôle supplémentaire soit réalisé avec des rats recevant une injection d'AGL ou de PTD non seulement après la réactivation des indices mais aussi avant la réinstallation du comportement de recherche. Malgré tout, ce test n'est pas une priorité du fait que de nombreux indices semblent indiquer que cette théorie ne s'appliquerait pas ici et ne pourrait donc pas expliquer le déficit mnésique observé. Tout d'abord, si l'effet relevait de la dépendance d'état, alors les animaux ayant reçu le PTD à 3 mg/kg montreraient également une réinstallation réduite. De plus, la théorie de la dépendance d'état s'applique pour les états physiologiques internes pendant l'acquisition de la mémoire (Gisquet-Verrier and Riccio, 2018), or dans notre cas, les rats ont acquis le comportement d'AAiv en l'absence d'AGL ou de PTD.

2.3 L'inhibition du NFκB n'altère pas la mémoire liée aux indices en absence d'extinction instrumentale préalable

Dans la modélisation de la consommation de cocaïne en AAiv, l'utilisation de l'extinction instrumentale permet de modéliser une période de sevrage, mais une période telle que celle-ci ne se retrouve pas chez les patients. Ainsi, certains pourraient argumenter qu'une période d'abstinence forcée pour modéliser le sevrage soit plus judicieuse. Bien que ce modèle ne soit pas non plus le plus commun chez les patients, il se retrouve chez certaines personnes et ne consiste pas, lui, en un nouvel apprentissage. Nous avons alors reproduit notre expérience de manipulation de la mémoire après une réactivation des indices associés à la cocaïne après une période d'abstinence forcée. De manière intéressante, le PTD à 1 mg/kg qui réduit significativement la réinstallation du comportement dans le cas où le comportement instrumental et le contexte avaient été éteints, n'a ici aucun effet sur le comportement de recherche. Cette différence peut s'expliquer par plusieurs raisons.

D'une part, différents mécanismes moléculaires sont impliqués dans ces différents types de mémoire associative (indice, contexte, instrumentale, cocaïne elle-même) (Bender and Torregrossa, 2021). Par exemple, l'inhibition de CaMKII dans la BLA altère la reconsolidation associée aux indices (Rich et al., 2016) alors qu'elle n'altère pas la reconsolidation associée au contexte (Arguello et al., 2014). Ainsi, le NFκB pourrait être impliqué dans la mémoire associée aux indices sans être impliqué dans la mémoire associée au contexte ou au comportement instrumental.

D'autre part, l'idée que la mémoire instrumentale puisse être réactivée et manipulée (à travers la reconsolidation) est controversée depuis l'émergence de la théorie de la reconsolidation appliquée à la dépendance (Vousden and Milton, 2017). En effet, peu d'études montrent une manipulation de la mémoire associée aux indices sans extinction instrumentale préalable. Ces études ont montré une diminution de la reconsolidation associée aux indices par l'utilisation d'un oligonucléotide anti-sens de Zif268, et une augmentation du comportement de recherche de cocaïne par l'activation des NMDAR dans la BLA (Lee et al., 2009, 2006). Le comportement instrumental est considéré comme étant très ancré et difficile à réactiver et destabiliser. Il serait intéressant de reproduire cette expérience en répétant les manipulations (réactivation + traitement) pour favoriser une possible altération de ce type de mémoire. On pourrait également introduire le comportement instrumental lui-même lors de la réactivation en laissant les orifices accessibles.

2.4 Expériences supplémentaires pour confirmer l'implication spécifique du NFκB

Dans le cadre des expériences étudiant l'implication du NFκB dans la mémoire liée aux indices associées à la cocaïne, nous avons utilisé deux agents pharmacologiques qui ont montré des effets similaires appuyant l'implication du NFκB dans ce processus. L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques administrés par voie systémique permet d'avoir une idée de l'implication globale d'un mécanisme/voie/facteur de transcription dans un processus. En revanche, cette technique ne permet pas ni une inhibition spécifique ni d'identifier une région cérébrale d'intérêt. Des études complémentaires sont prévues pour reproduire ces résultats en utilisant une technique de leurre, par le biais d'oligonucléotide contenant la séquence κB, infusé dans une structure particulière. Une stratégie identique a permis de confirmer l'implication du NFκB dans la reconsolidation de la mémoire de peur associée à un choc électrique dans l'hippocampe dorsal (de la Fuente et al., 2011).

Dans le but de cibler directement une structure dans laquelle le NFκB jouerait un rôle pendant la période de reconsolidation, des analyses moléculaires ont été entreprises dans plusieurs structures cérébrales de rats, 30 min après la réactivation des indices associés à la cocaïne et leurs contrôles. Nous avons choisi le délai de mis à mort de 30 min car plusieurs études ont montré des pics d'activation du NFκB allant de 10 à 30 min après la stimulation (de la Fuente et al., 2011; Kuebler et al., 2015; Li et al., 1994). Nous nous sommes donc placés à 30 min afin d'observer l'augmentation de l'activation de ce facteur. Parmi les structures possibles, l'amygdale et le NAc ont déjà été étudiés, alors que l'hippocampe dorsal et le mPFC sont en cours d'analyse. Ces structures ont été choisies pour leur implication dans la mémoire associative, émotionnelle et contextuelle déjà bien caractérisée dans la

consommation de cocaïne (Bender and Torregrossa, 2021). Ces structures ont, notamment, été largement impliquées dans les mécanismes de reconsolidation associée à la cocaïne (voir table 1, Correia et al., 2020).

Tout d'abord, du point de vue protéique, les premiers résultats moléculaires réalisés au niveau de l'amygdale et du NAc des animaux ne montrent pas d'activation du NFκB 30 min après la réactivation de la mémoire des indices. Nous avons choisi le marqueur d'acétylation sur la Lys310 de NFκBp65 comme indice d'activation du NFκB. Cette modification post-traductionnelle a été décrite comme essentielle à l'activité transcriptionnelle du NFκB (Chen et al., 2002). Du fait que nous utilisons des extraits protéiques nucléaires, nous avons aussi utilisé un anticorps reconnaissant le NFκBp65 total comme marqueur de translocation nucléaire. Cette absence d'effet peut s'expliquer par plusieurs points. Il se peut, tout d'abord, que le NFκB ne soit pas impliqué dans la reconsolidation de la mémoire liée aux indices au sein de ces deux structures et, ainsi, que l'effet mesuré avec les inhibiteurs du NFκB ne soit pas dû à une inhibition du facteur au niveau de ces structures. Les analyses complémentaires au sein d'autres structures telles que l'hippocampe dorsal ou le mPFC pourraient révéler un effet structure-spécifique. Il se peut, également, que le délai de mise à mort ne soit pas optimal. En effet, dans leur étude de reconsolidation liée à la mémoire de peur, de la Fuente et coll. (2011) ont mesuré une activation de facteur dans l'amygdale 15 min après la réexposition aux indices, une activation qui n'était plus visible 45 min après la réexposition aux indices. Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'à 30 min une activation ne soit finalement déjà plus visible ou trop faible pour être détectée par la technique du Western blot.

Du point de vue transcriptomique, les premières analyses réalisées au niveau de l'amygdale et du NAc ne font pas ressortir de modulation importante des gènes cibles d'intérêts. En revanche, quelques tendances au niveau de l'amygdale sont à souligner (tendance à un effet de la réactivation pour NFκBp105, ainsi qu'une tendance à un effet d'interaction réactivation x cocaïne pour IL-6 et CB2). Ces tendances suggèrent une implication de ces marqueurs dans la reconsolidation liée aux indices associées à la cocaïne et accentuent l'idée qu'avec un délai de mise à mort plus long, des effets plus prononcés dans l'amygdale auraient pu être obtenus.

Dans l'ensemble, ces premiers résultats moléculaires au sein de l'amygdale et du NAc nous indiquent la nécessité d'analyser d'autres structures et que le délai de mise à mort ne soit globalement pas optimal (trop long pour l'activation du NFκB et trop court pour la régulation transcriptomique). Ceci dissimulerait une possible intervention de ce système dans la reconsolidation liée aux indices associés à la cocaïne, notamment dans l'amygdale. Il serait intéressant dans le futur de reproduire

cette expérience comportementale avec des animaux qui seraient mis à mort soit 15 min soit 1 h 30 après la réactivation par les indices.

2.5 Les besoins futurs dans ce champ expérimental

Depuis le début des années 2000, de nombreuses études ont utilisé des paradigmes similaires pour l'étude de la mémoire associée à la cocaïne. L'idée d'intervenir sur la mémoire associative pour diminuer les risques de rechutes récurrents chez les patients a depuis pris de l'essor et d'autant plus stimulé cette recherche. En effet, l'absence de traitements pharmacologiques efficaces pour soutenir les thérapies psychosociales a encouragé de nombreuses études pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires sous-tendant la mémoire non-adaptée associée à la consommation de cocaïne. De nombreuses voies de signalisation et cibles moléculaires ont été identifiées (voir table 1, Correia et al., 2020) dont des inhibiteurs de la synthèse protéique, des intervenants de la neurotransmission glutamatergique (NMDAR), des récepteurs couplés aux protéines G (D1R, β -adrénergique, CB2) ou encore des facteurs épigénétiques (DNMT, HAT). Malgré tout, une analyse de toutes ces études nous permet de mettre en évidence l'importance du protocole de réactivation utilisé avant d'envisager une translation efficace de ces études vers un traitement chez l'Homme.

La reconsolidation et l'extinction sont deux mécanismes mnésiques en compétition (Eisenberg et al., 2003) et il apparaît que quand l'un est activé l'autre est bloqué. Ainsi, une diminution de la reconsolidation ou une augmentation de l'extinction résulterait en une diminution du comportement de recherche de cocaïne. L'analyse de tous les paradigmes expérimentaux utilisés pour l'étude de la reconsolidation ou l'extinction met en évidence l'élément essentiel de la réactivation : la durée et les répétitions. Une brève réexposition au contexte ou aux indices permet d'induire une reconsolidation, alors qu'une exposition plus prolongée induit une extinction. La question primordiale est donc de savoir où se trouve la frontière entre une brève exposition et une exposition prolongée. Dans leur étude, Rich et coll. (2016) déterminent que l'extinction des indices commence au bout de 60 présentations alors que 3 présentations induisent une reconsolidation. Pour ce qui est du contexte, cela semble plus flou. En effet, aucune étude ne s'est pour l'heure intéressée à l'extinction du contexte seul et les études s'intéressant à la reconsolidation du contexte déclarent des temps d'exposition très variables allant de 3 à 60 min, dont une majorité de 15 min. L'importance de savoir si notre protocole induit une reconsolidation ou une extinction est primordiale au vu de mécanismes opposés lors de ces deux événements mnésiques. Par exemple, alors que l'inhibition de CaMKII semble promouvoir l'extinction et altérer la reconsolidation (Rich et al., 2016), l'activation des NMDAR promeut à la fois l'extinction et la reconsolidation résultant dans des comportements de recherche de cocaïne

opposés (Lee et al., 2009; Torregrossa et al., 2010). Ces résultats soulignent la nécessité de contrôler la phase de réactivation et l'effet de l'agent pharmacologique afin de ne pas augmenter les comportements de recherche et les risques de rechute chez les patients (Taylor et al., 2009). Dans le cas de notre étude, il serait intéressant de mesurer l'effet de l'inhibition du NFκB dans un protocole d'extinction des indices associés à la cocaïne. De la Fuente et coll. (2011) ont montré que ce facteur était inversement mis en jeu dans la reconsolidation *versus* l'extinction. Dans leur paradigme de conditionnement de peur, ils ont pu mesurer que le NFκB était activé 15 min après une réactivation de la mémoire liée au contexte, alors qu'il était inhibé après une extinction de cette mémoire.

L'ensemble de ces études révèle aussi un manque de validation de ces effets dans le temps, à savoir si la diminution du comportement de recherche perdure. La mesure de la recherche de cocaïne la plus lointaine après une manipulation mnésique est de 16 jours (Sorg et al., 2015). Il serait donc nécessaire pour les études futures de mesurer la validité de ces effets sur le long terme. Afin de favoriser une altération sur le long terme, il serait, par ailleurs, préférable de mettre au point des sessions de réactivations + interventions répétées. Il semble difficile d'envisager qu'une mémoire puisse être altérée par une seule manipulation notamment chez les cocaïnomanes.

Enfin, les paramètres (indices, contexte, cocaïne ou un mixte) utilisés pour réactiver la mémoire semblent jouer un rôle important. Ces paramètres sont essentiels à la réactivation des souvenirs afin que ces derniers deviennent labiles. En effet, deux théories s'opposent sur les paramètres nécessaires pour une réactivation efficace de la mémoire. La première stipule que pour favoriser la réactivation des souvenirs, le rappel doit être complet c'est-à-dire dans le même contexte, avec les mêmes indices et le même état interne (Tronel et al., 2005). La deuxième stipule que dans le cas d'une mémoire très ancrée, celle-ci devient de plus en plus résistante à la réactivation. Cette théorie soutient l'idée que l'ajout d'une erreur de prédiction par l'addition d'un élément nouveau permet de favoriser la réactivation dans le but de mettre à jour la mémoire (Sinclair and Barense, 2019). Cette réflexion prend d'autant plus d'importance dans le cas de la dépendance aux drogues, la mémoire devenant particulièrement renforcée. Dans notre étude, l'utilisation d'un contexte de réactivation différent nous a permis d'isoler la mémoire associée aux indices mais également d'avoir un élément nouveau. Afin de déterminer le réel intérêt de ce nouveau contexte, il serait intéressant de reproduire l'expérience avec la réactivation dans le même contexte d'acquisition.

De manière générale, il apparaît que la stratégie pharmacologique idéale serait celle qui permet une diminution de la reconsolidation ainsi qu'une augmentation de l'extinction, et que cet effet soit similaire pour tous les types de mémoire associés à la cocaïne.

Les études précliniques chez l'animal doivent encore mettre au point de nombreux aspects techniques associés aux protocoles de réactivation et permettre une transposition efficace chez l'Homme. Malgré tout, des études cliniques pilotes ont été entreprises et montrent des résultats particulièrement intéressants. Dans leur étude en double aveugle ciblant plusieurs substances dont la cocaïne, Loneragan et coll. (2016) ont donné du propranolol ou placebo à des patients avant qu'ils lisent un script personnalisé détaillant une expérience de consommation de drogue. La lecture de ce script réactive la mémoire associée à la drogue provoquant la nécessité d'une phase de reconsolidation. Cette étude a mis en évidence une diminution des taux auto-déclarés de craving chez les patients traités au propranolol. Malheureusement cette étude, bien qu'intéressante, manque de donnée sur le long terme : maintien des taux de craving bas et taux de rechute chez les patients traités au propranolol. De plus, un problème technique subsiste dans leur protocole, avec le traitement donné avant la réactivation, nous ne pouvons conclure sur un effet dans la reconsolidation ou dans le rappel. Dans une autre étude, Saladin et coll. (2013) ont montré qu'un traitement au propranolol donné après une session d'exposition aux indices associés à la cocaïne diminuait significativement les taux de craving et les réactions physiologiques à la présentation de ces mêmes indices 24 h plus tard. Dans ce protocole où le traitement est donné après la réactivation on peut supposer que l'effet observé résulte d'un effet du propranolol sur la reconsolidation. Bien que ces résultats soient prometteurs, un suivi une semaine plus tard ne montre plus aucun effet du traitement. Ceci montre la nécessité d'adapter les protocoles notamment en répétant les manipulations mnésiques.

Conclusion et perspectives

En conclusion, les différents résultats obtenus pendant ma thèse semblent défendre l'hypothèse d'une dualité dans l'implication du NFκB. L'activation du NFκB serait, au départ, mise en jeu pendant la consommation de cocaïne à des fins protectrices par des mécanismes de régulations homéostatiques, et du fait des multiples fonctions de ce facteur, cette mise en jeu participerait *in fine* au développement de souvenirs renforcés promouvant la perpétuation du comportement et les épisodes de rechute.

L'analyse de nos résultats nous permet de supposer que l'augmentation importante de la neurotransmission dopaminergique dans le NAc induite par la cocaïne va stimuler la voie du NFκB à travers plusieurs voies dont celles impliquant les récepteurs D1 et D2. La stimulation de ces deux voies permettrait l'intervention de mécanismes de régulation protecteurs médiés par le NFκB par l'inhibition de l'apoptose à travers les D1R (Lepsch et al., 2009) ainsi que par la limitation de la consommation de cocaïne à travers les D2R (Bock et al., 2013). En parallèle, la stimulation de ces voies par la cocaïne est connue pour induire des plasticités synaptiques notamment au niveau du NAc (Bock et al., 2013; Russo et al., 2009). Dans leur étude, Russo et coll. (2009) décrivent une voie D1R-ΔFosB-NFκB-BDNF qui serait essentielle à l'augmentation des épines dendritiques du NAc induite par la cocaïne. Quant à Bock et coll. (2013) leur étude électrophysiologique met en avant la mise en place d'un processus de potentialisation synaptique qui serait généralisé à tous les animaux consommant de la cocaïne pour des afférences sur les D1R-MSN alors qu'il serait spécifique aux animaux résilients sur les D2R-MSN. Ainsi, de par le rôle primordial du NFκB dans la plasticité synaptique, on peut supposer que ce facteur est largement impliqué dans ces mécanismes. La mise en jeu de ces processus de plasticité synaptique et de potentialisation synaptique peut expliquer la mémoire renforcée entre les effets de la cocaïne et les indices. En effet, plusieurs études ont montré une augmentation de l'arborisation dendritique dans le NAc induit par la cocaïne, cette augmentation est soutenue par des processus de synaptogénèse et de formation de synapses silencieuses passant de 10 à 30% (Dong, 2016). De manière intéressante dans leur étude, Wright et coll. (2020) ont montré que les synapses silencieuses formées lors de la consommation de cocaïne évoluaient et devenaient matures pendant l'abstinence par le biais notamment de l'incorporation de CP-AMPA au niveau des afférences provenant de la BLA (Lee et al., 2013) renforçant la connexion entre ces deux structures hautement impliquées dans la mémoire émotionnelle associative. Par ailleurs, il a été observé que l'induction d'une LTD au niveau de ces synapses réduisait l'incubation du craving induit par les indices associés à la cocaïne (Lee et al., 2013). Enfin, Wright et coll. (2020) ont montré qu'une réactivation du sou-

venir associée aux indices pouvaient rendre les synapses préalablement devenue matures silencieuses et que prévenir leur re-maturation réduisait la réinstallation du comportement de recherche de cocaïne. Le NFκB est connu pour réguler l'expression de nombreux intervenants dans les processus de potentialisation synaptique et de synaptogénèse (IL-1β, IL-6, PSD-95, NCAM, AMPAR ou encore NMDAR). On peut supposer une implication du NFκB dans la maturation et la re-maturation de ces synapses reflétant un rôle du NFκB dans les processus de consolidation et de reconsolidation. De plus, la stimulation du NFκB par la voie du TLR4 par la cocaïne pourrait avoir un rôle synergique expliquant d'autant plus la mise en place de ces souvenirs anormalement renforcés.

Pour conclure, on peut ainsi émettre l'hypothèse que la cocaïne induisant une augmentation importante de la neurotransmission dopaminergique au niveau du NAc par le biais de son action sur les DAT ou sur le TLR4 va stimuler la voie du NFκB. Cette voie serait principalement mise en jeu dans un but de protection de l'organisme aux effets délétères de la cocaïne. Le NFκB permettrait ainsi à la fois une limitation comportementale de la consommation de cocaïne et une cytoprotection tissulaire. La mise en jeu du NFκB permettrait, en parallèle, le développement de processus de plasticité synaptique entraînant à terme un renforcement de la mémoire associative liée à la consommation de cocaïne.

L'idée d'utiliser une stratégie anti-inflammatoire pour les thérapies contre la dépendance aux drogues semble prometteuse. Plusieurs études précliniques et cliniques ont démontré des résultats d'efficacité dans la dépendance à l'alcool (Kohno et al., 2019; Ray et al., 2014). Néanmoins, peu d'études ont utilisé ces stratégies dans la dépendance à la cocaïne bien qu'elles aient démontré des résultats intéressants. Chez l'animal, l'administration de (+)naltrexone (antagoniste TL4) prévient le développement d'une CPP pour la cocaïne chez le rat (Northcutt et al., 2015). L'inhibition spécifique de TLR4 ou d'IL-1β au sein de la VTA prévient la réinstallation du comportement induite par une injection de cocaïne, alors que l'activation spécifique de TLR4 induit à elle seule une réinstallation du comportement de recherche de cocaïne (Brown et al., 2018). Ces résultats indiquent, chez l'animal, que le TLR4 et l'IL-1β sont des médiateurs importants des effets de la cocaïne sur le système dopaminergique au sein de la voie mésocorticolimbique. De plus, l'administration systémique de minocycline et d'ibudilast, des agents antibiotiques et anti-inflammatoires, prévient l'établissement d'une sensibilisation locomotrice chez le rongeur (Chen et al., 2009; Poland et al., 2016). Chez l'Homme, deux études pilotes utilisant le N-acétylcystéine, un agent anti-inflammatoire et antioxydant, sont particulièrement intéressantes (LaRowe et al., 2013, 2007). Dans leur étude de 2007, des patients cocaïnomanes reçoivent le N-acétylcystéine ou placebo pendant plusieurs jours dans le cadre hospitalier. Le dernier jour une mesure de réactivité aux indices (« cue-reactivity ») indique une diminution des taux d'envie ainsi qu'un temps réduit devant les images associées à la

cocaïne. Dans leur étude de 2013, les patients cocaïnomanes reçoivent un traitement de N-acétylcystéine ou placebo quotidiennement pendant 8 semaines. De manière intéressante, cette étude ne montre pas d'effet sur la consommation des patients mais démontre une augmentation du temps avant rechute chez les patients déjà abstinents. En notant que les patients de l'étude de 2007 étaient également abstinents car hospitalisés, on peut supposer que le traitement est uniquement efficace en absence de cocaïne avec comme propriété de prévenir les taux de rechutes.

A l'heure actuelle, il apparaît difficile d'envisager une stratégie anti-inflammatoire ciblant le NF κ B, notamment dans le cas de patients toujours consommateurs. Plus d'études sont nécessaires afin de comprendre le rôle de ce facteur à toutes les étapes de la mise en place de la pathologie. Pour cela, une étude longitudinale est nécessaire afin de connaître la cinétique d'implication du NF κ B dans la consommation de cocaïne. En revanche, il apparaît que dans le cas de patients déjà abstinents, l'inhibition de ce facteur puisse être bénéfique en réduisant les risques de rechute bien que son implication dans la reconsolidation *versus* l'extinction doive être encore approfondie afin d'avoir un protocole de réactivation de la mémoire efficace et adapté.

Bibliographie

- A -

- Ahmed, S.H., Lütjens, R., van der Stap, L.D., Lekic, D., Romano-Spica, V., Morales, M., Koob, G.F., Repunte-Canonigo, V., Sanna, P.P., 2005. Gene expression evidence for remodeling of lateral hypothalamic circuitry in cocaine addiction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 11533–11538. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504438102>
- Albensi, B.C., Mattson, M.P., 2000. Evidence for the involvement of TNF and NF-kappaB in hippocampal synaptic plasticity. *Synap. N. Y. N* 35, 151–159. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2396\(200002\)35:2<151::AID-SYN8>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2396(200002)35:2<151::AID-SYN8>3.0.CO;2-P)
- Ang, E., Chen, J., Zagouras, P., Magna, H., Holland, J., Schaeffer, E., Nestler, E.J., 2001. Induction of nuclear factor-kappaB in nucleus accumbens by chronic cocaine administration. *J. Neurochem.* 79, 221–224.
- Antoine, J., Berndt, N., Astudillo, M., Cairns, D., Jahr, S., Jones, A., Kuijpers, W., Llorens, N., Lyons, S., Maffli, E., Magliocchetti, N., Molina Olivares, M., Palle, C., Schwarzkopf, L., Wisselink, J., Montanari, L., 2020. Cocaine treatment demands in 10 western European countries: observed trends between 2011 and 2018. *Addict. Abingdon Engl.* <https://doi.org/10.1111/add.15237>
- Arguello, A.A., Hodges, M.A., Wells, A.M., Lara, H., Xie, X., Fuchs, R.A., 2014. Involvement of amygdalar protein kinase A, but not calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, in the reconsolidation of cocaine-related contextual memories in rats. *Psychopharmacology (Berl.)* 231, 55–65. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3203-9>

- B -

- Baik, J.-H., 2013. Dopamine signaling in food addiction: role of dopamine D2 receptors. *BMB Rep.* 46, 519–526. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2013.46.11.207>
- Bao, Z., Guan, S., Cheng, C., Wu, S., Wong, S.H., Kemeny, D.M., Leung, B.P., Wong, W.S.F., 2009. A novel anti-inflammatory role for andrographolide in asthma via inhibition of the nuclear factor-kappaB pathway. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 179, 657–665. <https://doi.org/10.1164/rccm.200809-1516OC>
- Barnett, G., Hawks, R., Resnick, R., 1981. Cocaine pharmacokinetics in humans. *J. Ethnopharmacol.* 3, 353–366. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(81\)90063-5](https://doi.org/10.1016/0378-8741(81)90063-5)
- Barondes, S.H., Cohen, H.D., 1968. Memory impairment after subcutaneous injection of acetoxycycloheximide. *Science* 160, 556–557. <https://doi.org/10.1126/science.160.3827.556>
- Belin-Rauscent, A., Foyssac, M., Bonci, A., Belin, D., 2016. How preclinical models evolved to resemble the diagnostic criteria of drug addiction. *Biol. Psychiatry* 79, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.01.004>
- Bello, E.P., Mateo, Y., Gelman, D.M., Noaín, D., Shin, J.H., Low, M.J., Alvarez, V.A., Lovinger, D.M., Rubinstein, M., 2011. Cocaine supersensitivity and enhanced motivation for reward in mice lacking dopamine D2 autoreceptors. *Nat. Neurosci.* 14, 1033–1038. <https://doi.org/10.1038/nn.2862>
- Bender, B.N., Torregrossa, M.M., 2021. Dorsolateral striatum dopamine-dependent cocaine seeking is resistant to pavlovian cue extinction in male and female rats. *Neuropharmacology* 182, 108403. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108403>
- Bender, B.N., Torregrossa, M.M., 2020. Molecular and circuit mechanisms regulating cocaine memory. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 77, 3745–3768. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03498-8>
- Bera, R., Ahmed, S.K.M., Sarkar, L., Sen, T., Karmakar, S., 2014. Pharmacokinetic analysis and tissue distribution of andrographolide in rat by a validated LC-MS/MS method. *Pharm. Biol.* 52, 321–329. <https://doi.org/10.3109/13880209.2013.836544>
- Berridge, K.C., 2004. Motivation concepts in behavioral neuroscience. *Physiol. Behav., Reviews on Ingestive Science* 81, 179–209. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.02.004>
- Blais, V., Rivest, S., 2003. [Role of the innate immune response in the brain]. *Med. Sci. MS* 19, 981–987. <https://doi.org/10.1051/medsci/20031910981>
- Bock, R., Shin, J.H., Kaplan, A.R., Dobi, A., Markey, E., Kramer, P.F., Gremel, C.M., Christensen, C.H., Adrover, M.F., Alvarez, V.A., 2013. Strengthening the accumbal indirect pathway promotes resilience to compulsive cocaine use. *Nat. Neurosci.* 16, 632–638. <https://doi.org/10.1038/nn.3369>

- Bourdy, R., Barrot, M., 2012. A new control center for dopaminergic systems: pulling the VTA by the tail. *Trends Neurosci.* 35, 681–690. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.06.007>
- Bouton, M.E., 2019. Extinction of instrumental (operant) learning: interference, varieties of context, and mechanisms of contextual control. *Psychopharmacology (Berl.)* 236, 7–19. <https://doi.org/10.1007/s00213-018-5076-4>
- Brown, J., Wang, H., Hajishengallis, G.N., Martin, M., 2011. TLR-signaling networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk. *J. Dent. Res.* 90, 417–427. <https://doi.org/10.1177/0022034510381264>
- Brown, K.T., Levis, S.C., O'Neill, C.E., Northcutt, A.L., Fabisiak, T.J., Watkins, L.R., Bachtell, R.K., 2018. Innate immune signaling in the ventral tegmental area contributes to drug-primed reinstatement of cocaine seeking. *Brain Behav. Immun.* 67, 130–138. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.08.012>
- Bu, Q., Hu, Z., Chen, F., Zhu, R., Deng, Y., Shao, X., Li, Y., Zhao, J., Li, H., Zhang, B., Lv, L., Yan, G., Zhao, Y., Cen, X., 2012. Transcriptome analysis of long non-coding RNAs of the nucleus accumbens in cocaine-conditioned mice. *J. Neurochem.* 123, 790–799. <https://doi.org/10.1111/jnc.12006>
- Burton, A.C., Nakamura, K., Roesch, M.R., 2015. From ventral-medial to dorsal-lateral striatum: neural correlates of reward-guided decision-making. *Neurobiol. Learn. Mem.* 117, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.05.003>

- C -

- Carboni, E., Spieleswoy, C., Vacca, C., Nosten-Bertrand, M., Giros, B., Di Chiara, G., 2001. Cocaine and amphetamine increase extracellular dopamine in the nucleus accumbens of mice lacking the dopamine transporter gene. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, RC141: 1-4.
- Chen, H., Uz, T., Manev, H., 2009. Minocycline affects cocaine sensitization in mice. *Neurosci. Lett.* 452, 258–261. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.01.078>
- Chen, L., Mu, Y., Greene, W.C., 2002. Acetylation of RelA at discrete sites regulates distinct nuclear functions of NF- κ B. *EMBO J.* 21, 6539–6548. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf660>
- Chen, R., McIntosh, S., Hemby, S.E., Sun, H., Sexton, T., Martin, T.J., Childers, S.R., 2018. High and low doses of cocaine intake are differentially regulated by dopamine D2 receptors in the ventral tegmental area and the nucleus accumbens. *Neurosci. Lett.* 671, 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.02.026>
- Chen, Y.-Y., Hsu, M.-J., Hsieh, C.-Y., Lee, L.-W., Chen, Z.-C., Sheu, J.-R., 2014. Andrographolide inhibits nuclear factor- κ B activation through JNK-Akt-p65 signaling cascade in tumor necrosis factor- α -stimulated vascular smooth muscle cells. *ScientificWorldJournal* 2014, 130381. <https://doi.org/10.1155/2014/130381>
- Clark, K.H., Wiley, C.A., Bradberry, C.W., 2013. Psychostimulant abuse and neuroinflammation: emerging evidence of their interconnection. *Neurotox. Res.* 23, 174–188. <https://doi.org/10.1007/s12640-012-9334-7>
- Corbit, L.H., Balleine, B.W., 2016. Learning and Motivational Processes Contributing to Pavlovian-Instrumental Transfer and Their Neural Bases: Dopamine and Beyond. *Curr. Top. Behav. Neurosci.* 27, 259–289. https://doi.org/10.1007/7854_2015_388
- Correia, C., Romieu, P., Olmstead, M.C., Befort, K., 2020. Can cocaine-induced neuroinflammation explain maladaptive cocaine-associated memories? *Neurosci. Biobehav. Rev.* 111, 69–83. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.01.001>
- Crawford, F.C., Wood, M.L., Wilson, S.E., Mathura, V.S., Hollen, T.R., Geall, F., Kolippakkam, D.N., Mullan, M.J., 2006. Cocaine induced inflammatory response in human neuronal progenitor cells. *J. Neurochem.* 97, 662–674. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03760.x>
- Crews, F.T., Zou, J., Qin, L., 2011. Induction of innate immune genes in brain create the neurobiology of addiction. *Brain Behav. Immun.* 25 Suppl 1, S4–S12. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.03.003>

- D -

- de Carvalho, C.R., Takahashi, R.N., 2017. Cannabidiol disrupts the reconsolidation of contextual drug-associated memories in Wistar rats. *Addict. Biol.* 22, 742–751. <https://doi.org/10.1111/adb.12366>
- de la Fuente, V., Federman, N., Fustiñana, M.S., Zalcmán, G., Romano, A., 2014. Calcineurin phosphatase as a negative regulator of fear memory in hippocampus: control on nuclear factor- κ B signaling in consolidation and reconsolidation. *Hippocampus* 24, 1549–1561. <https://doi.org/10.1002/hipo.22334>
- de la Fuente, V., Freudenthal, R., Romano, A., 2011. Reconsolidation or extinction: transcription factor switch in the determination of memory course after retrieval. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 5562–5573. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6066-10.2011>

- de Sa Nogueira, D., Bourdy, R., Filliol, D., Quessada, C., McCort-Tranchepain, I., Acher, F., Zwiller, J., Romieu, P., Befort, K., 2020. LSP2-9166, an orthosteric mGlu4 and mGlu7 receptor agonist, reduces cocaine self-administration under a progressive ratio schedule in rats. *Neurosci. Lett.* 135603. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.135603>
- De Sa Nogueira, D., Merienne, K., Befort, K., 2019. Neuroepigenetics and addictive behaviors: Where do we stand? *Neurosci. Biobehav. Rev.* 106, 58–72. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.08.018>
- Deepmala, null, Slattery, J., Kumar, N., Delhey, L., Berk, M., Dean, O., Spielholz, C., Frye, R., 2015. Clinical trials of N-acetylcysteine in psychiatry and neurology: A systematic review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 55, 294–321. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.04.015>
- Delamater, A.R., Oakeshott, S., 2007. Learning about multiple attributes of reward in Pavlovian conditioning. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1104, 1–20. <https://doi.org/10.1196/annals.1390.008>
- Depoortere, R.Y., Li, D.H., Lane, J.D., Emmett-Oglesby, M.W., 1993. Parameters of self-administration of cocaine in rats under a progressive-ratio schedule. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 45, 539–548. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(93\)90503-1](https://doi.org/10.1016/0091-3057(93)90503-1)
- Deroche-Gamonet, V., Belin, D., Piazza, P.V., 2004. Evidence for Addiction-like Behavior in the Rat. *Science* 305, 1014–1017. <https://doi.org/10.1126/science.1099020>
- Deroche-Gamonet, V., Piat, F., Le Moal, M., Piazza, P.V., 2002. Influence of cue-conditioning on acquisition, maintenance and relapse of cocaine intravenous self-administration. *Eur. J. Neurosci.* 15, 1363–1370. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.01974.x>
- Dey, S., Sarkar, M., Giri, B., 2016. Anti-inflammatory and Anti-tumor Activities of Parthenolide: An Update. *J. Chem. Biol. Ther.* 01. <https://doi.org/10.4172/2572-0406.1000107>
- 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.14.5274>
- Dietrich, J.-B., Mangeol, A., Revel, M.-O., Burgun, C., Anis, D., Zwiller, J., 2005. Acute or repeated cocaine administration generates reactive oxygen species and induces antioxidant enzyme activity in dopaminergic rat brain structures. *Neuropharmacology* 48, 965–974. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2005.01.018>
- DiSabato, D., Quan, N., Godbout, J.P., 2016. Neuroinflammation: The Devil is in the Details. *J. Neurochem.* 139, 136–153. <https://doi.org/10.1111/jnc.13607>
- Dong, Y., 2016. Silent Synapse-Based Circuitry Remodeling in Drug Addiction. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 19. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyv136>
- Dong, Y., Nestler, E.J., 2014. The neural rejuvenation hypothesis of cocaine addiction. *Trends Pharmacol. Sci.* 35, 374–383. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2014.05.005>
- Dresselhaus, E.C., Meffert, M.K., 2019. Cellular Specificity of NF- κ B Function in the Nervous System. *Front. Immunol.* 10, 1043. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01043>
- DSM-V : American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders* (5th ed.). Arlington, VA: Author.
- Dunbar, A.B., Taylor, J.R., 2017. Garcinol Blocks the Reconsolidation of Multiple Cocaine-Paired Cues after a Single Cocaine-Reactivation Session. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 42, 1884–1892. <https://doi.org/10.1038/npp.2017.27>
- Dunbar, A.B., Taylor, J.R., 2016. Inhibition of protein synthesis but not β -adrenergic receptors blocks reconsolidation of a cocaine-associated cue memory. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 23, 391–398. <https://doi.org/10.1101/lm.042838.116>

- E -

- Eiden, C., Vincent, M., Serrand, C., Serre, A., Richard, N., Picot, M.-C., Frauger, E., Fouilhé, N., Daveluy, A., Peyrière, H., French Addictovigilance Network (FAN), 2020. Health consequences of cocaine use in France: data from the French Addictovigilance Network. *Fundam. Clin. Pharmacol.* <https://doi.org/10.1111/fcp.12603>
- Eisenberg, M., Kobil, T., Berman, D.E., Dudai, Y., 2003. Stability of retrieved memory: inverse correlation with trace dominance. *Science* 301, 1102–1104. <https://doi.org/10.1126/science.1086881>
- Engelmann, C., Haenold, R., 2016. Transcriptional Control of Synaptic Plasticity by Transcription Factor NF- κ B. *Neural Plast.* 2016, 7027949. <https://doi.org/10.1155/2016/7027949>
- EU Drug Markets Report. 2019. EMCDDA, Europol, Lisbon, November 2019

Everitt, B.J., 2014. Neural and psychological mechanisms underlying compulsive drug seeking habits and drug memories—indications for novel treatments of addiction. *Eur. J. Neurosci.* 40, 2163–2182. <https://doi.org/10.1111/ejn.12644>

- F -

- Feltenstein, M.W., See, R.E., 2008. The neurocircuitry of addiction: an overview. *Br. J. Pharmacol.* 154, 261–274. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.51>
- Fonteneau, M., Filliol, D., Anglard, P., Befort, K., Romieu, P., Zwiller, J., 2017. Inhibition of DNA methyltransferases regulates cocaine self-administration by rats: a genome-wide DNA methylation study. *Genes Brain Behav.* 16, 313–327. <https://doi.org/10.1111/gbb.12354>
- Freeman, W.M., Lull, M.E., Patel, K.M., Brucklacher, R.M., Morgan, D., Roberts, D.C.S., Vrana, K.E., 2010. Gene expression changes in the medial prefrontal cortex and nucleus accumbens following abstinence from cocaine self-administration. *BMC Neurosci.* 11, 29. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-11-29>
- Freudenthal, R., Boccia, M.M., Acosta, G.B., Blake, M.G., Merlo, E., Baratti, C.M., Romano, A., 2005. NF-kappaB transcription factor is required for inhibitory avoidance long-term memory in mice. *Eur. J. Neurosci.* 21, 2845–2852. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04126.x>
- Fuchs, R.A., Bell, G.H., Ramirez, D.R., Eaddy, J.L., Su, Z., 2009. Basolateral amygdala involvement in memory reconsolidation processes that facilitate drug context-induced cocaine seeking. *Eur. J. Neurosci.* 30, 889–900. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06888.x>

- G -

- Gisquet-Verrier, P., Lynch, J.F., Cutolo, P., Toledano, D., Ulmen, A., Jasnow, A.M., Riccio, D.C., 2015. Integration of New Information with Active Memory Accounts for Retrograde Amnesia: A Challenge to the Consolidation/Reconsolidation Hypothesis? *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 35, 11623–11633. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1386-15.2015>
- Gisquet-Verrier, P., Riccio, D.C., 2018. Memory Integration as a Challenge to the Consolidation/Reconsolidation Hypothesis: Similarities, Differences and Perspectives. *Front. Syst. Neurosci.* 12, 71. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2018.00071>
- González-Mariño, I., Baz-Lomba, J.A., Alygizakis, N.A., Andrés-Costa, M.J., Bade, R., Bannwarth, A., Barron, L.P., Been, F., Benaglia, L., Berset, J.-D., Bijlsma, L., Bodík, I., Brenner, A., Brock, A.L., Burgard, D.A., Castriñanò, E., Celma, A., Christophoridis, C.E., Covaci, A., Delémont, O., de Voogt, P., Devault, D.A., Dias, M.J., Emke, E., Esseiva, P., Fatta-Kassinos, D., Fedorova, G., Fytianos, K., Gerber, C., Grabic, R., Gracia-Lor, E., Grüner, S., Gunnar, T., Hapeshi, E., Heath, E., Helm, B., Hernández, F., Kankaanpää, A., Karolak, S., Kasprzyk-Hordern, B., Krizman-Matasic, I., Lai, F.Y., Lechowicz, W., Lopes, A., López de Alda, M., López-García, E., Löve, A.S.C., Mastroianni, N., McEneff, G.L., Montes, R., Munro, K., Nefau, T., Oberacher, H., O'Brien, J.W., Oertel, R., Olafsdottir, K., Picó, Y., Plósz, B.G., Polesel, F., Postigo, C., Quintana, J.B., Ramin, P., Reid, M.J., Rice, J., Rodil, R., Salgueiro-González, N., Schubert, S., Senta, I., Simões, S.M., Sremacki, M.M., Styszko, K., Terzic, S., Thomaidis, N.S., Thomas, K.V., Tschärke, B.J., Udrișard, R., van Nuijs, A.L.N., Yargeau, V., Zuccato, E., Castiglioni, S., Ort, C., 2020. Spatio-temporal assessment of illicit drug use at large scale: evidence from 7 years of international wastewater monitoring. *Addict. Abingdon Engl.* 115, 109–120. <https://doi.org/10.1111/add.14767>
- Gold, P.E., & McGaugh, J.L., 1975. A Single-trace, Two Process View of Memory Storage Process. In D. Deutsch & J.A. Deutsch (Eds.), *Short-term memory*. New York: Academic Press
- Gopal, Y.N.V., Arora, T.S., Van Dyke, M.W., 2007. Parthenolide specifically depletes histone deacetylase 1 protein and induces cell death through ataxia telangiectasia mutated. *Chem. Biol.* 14, 813–823. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2007.06.007>
- Grecksch, G., Matthies, H., 1980. Two sensitive periods for the amnesic effect of anisomycin. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 12, 663–665. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(80\)90145-8](https://doi.org/10.1016/0091-3057(80)90145-8)
- Guha, P., Harraz, M.M., Snyder, S.H., 2016. Cocaine elicits autophagic cytotoxicity via a nitric oxide-GAPDH signaling cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 1417–1422. <https://doi.org/10.1073/pnas.1524860113>

- H -

- Han, J.Y., Heo, J.S., Lee, Y.J., Lee, J.H., Taub, M., Han, H.J., 2007. Dopamine stimulates 45Ca²⁺ uptake through cAMP, PLC/PKC, and MAPKs in renal proximal tubule cells. *J. Cell. Physiol.* 211, 486–494. <https://doi.org/10.1002/jcp.20956>
- Hanamsagar, R., Hanke, M.L., Kielian, T., 2012. Toll-like receptor (TLR) and inflammasome actions in the central nervous system. *Trends Immunol.* 33, 333–342. <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.03.001>
- Hatanaka, N., Seki, T., Inoue, J.-I., Tero, A., Suzuki, T., 2019. Critical roles of IκBα and RelA phosphorylation in transitional oscillation in NF-κB signaling module. *J. Theor. Biol.* 462, 479–489. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2018.11.023>
- Hayden, M.S., Ghosh, S., 2004. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.* 18, 2195–2224. <https://doi.org/10.1101/gad.1228704>
- Hodos, W., 1961. Progressive ratio as a measure of reward strength. *Science* 134, 943–944. <https://doi.org/10.1126/science.134.3483.943>
- Hope, B.T., Simmons, D.E., Mitchell, T.B., Kreuter, J.D., Mattson, B.J., 2006. Cocaine-induced locomotor activity and Fos expression in nucleus accumbens are sensitized for 6 months after repeated cocaine administration outside the home cage. *Eur. J. Neurosci.* 24, 867–875. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04969.x>
- Hsieh, C.Y., Hsu, M.J., Hsiao, G., Wang, Y.H., Huang, C.W., Chen, S.W., Jayakumar, T., Chiu, P.T., Chiu, Y.H., Sheu, J.R., 2011. Andrographolide enhances nuclear factor-kappaB subunit p65 Ser536 dephosphorylation through activation of protein phosphatase 2A in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 286, 5942–5955. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.123968>
- Huang, B., Yang, X.-D., Lamb, A., Chen, L.-F., 2010. Posttranslational modifications of NF-kappaB: another layer of regulation for NF-kappaB signaling pathway. *Cell. Signal.* 22, 1282–1290. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.03.017>
- Huang, Y.H., Lin, Y., Mu, P., Lee, B.R., Brown, T.E., Wayman, G., Marie, H., Liu, W., Yan, Z., Sorg, B.A., Schlüter, O.M., Zukin, R.S., Dong, Y., 2009. In vivo cocaine experience generates silent synapses. *Neuron* 63, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.06.007>
- Hubner, C.B., Moreton, J.E., 1991. Effects of selective D1 and D2 dopamine antagonists on cocaine self-administration in the rat. *Psychopharmacology (Berl.)* 105, 151–156. <https://doi.org/10.1007/BF02244301>
- Hutchinson, M.R., Watkins, L.R., 2014. Why is neuroimmunopharmacology crucial for the future of addiction research? *Neuropharmacology* 76 Pt B, 218–227. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.05.039>

- I -

- ICD-10 : World Health Organization(WHO). (1993). The ICD-10 classification of mental and behavioural disorders. World Health Organization.
- Ikegami, A., Duvauchelle, C.L., 2004. Dopamine mechanisms and cocaine reward. *Int. Rev. Neurobiol.* 62, 45–94. [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(04\)62002-2](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(04)62002-2)
- Ikemoto, S., 2010. Brain reward circuitry beyond the mesolimbic dopamine system: A neurobiological theory. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 35, 129–150. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.02.001>
- Ishiwari, K., Weber, S.M., Mingote, S., Correa, M., Salamone, J.D., 2004. Accumbens dopamine and the regulation of effort in food-seeking behavior: modulation of work output by different ratio or force requirements. *Behav. Brain Res.* 151, 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2003.08.007>
- Ito, R., Dalley, J.W., Robbins, T.W., Everitt, B.J., 2002. Dopamine release in the dorsal striatum during cocaine-seeking behavior under the control of a drug-associated cue. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 6247–6253. <https://doi.org/20026606>

- J -

- Jayakumar, T., Hsieh, C.-Y., Lee, J.-J., Sheu, J.-R., 2013. Experimental and Clinical Pharmacology of *Andrographis paniculata* and Its Major Bioactive Phytoconstituent Andrographolide. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM* 2013, 846740. <https://doi.org/10.1155/2013/846740>

- K -

- Kalivas, P.W., Volkow, N.D., 2005. The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *Am. J. Psychiatry* 162, 1403–1413. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.162.8.1403>
- Kampman, K.M., 2019. The treatment of cocaine use disorder. *Sci. Adv.* 5, eaax1532. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax1532>
- Kassed, C.A., Willing, A.E., Garbuzova-Davis, S., Sanberg, P.R., Pennypacker, K.R., 2002. Lack of NF-kappaB p50 exacerbates degeneration of hippocampal neurons after chemical exposure and impairs learning. *Exp. Neurol.* 176, 277–288. <https://doi.org/10.1006/exnr.2002.7967>
- Kauer, J.A., Malenka, R.C., 2007. Synaptic plasticity and addiction. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 844–858. <https://doi.org/10.1038/nrn2234>
- Kohno, M., Link, J., Dennis, L.E., McCreedy, H., Huckans, M., Hoffman, W.F., Loftis, J.M., 2019. Neuroinflammation in addiction: A review of neuroimaging studies and potential immunotherapies. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 179, 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2019.01.007>
- Koob, G.F., 2015. The dark side of emotion: the addiction perspective. *Eur. J. Pharmacol.* 753, 73–87. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.11.044>
- Koob, G.F., Le Moal, M., 2008. Review. Neurobiological mechanisms for opponent motivational processes in addiction. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 363, 3113–3123. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0094>
- Koob, G.F., Le Moal, M., 1997. Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science* 278, 52–58. <https://doi.org/10.1126/science.278.5335.52>
- Koob, G.F., Volkow, N.D., 2016. Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *Lancet Psychiatry* 3, 760–773. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(16\)00104-8](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(16)00104-8)
- Korpi, E.R., den Hollander, B., Farooq, U., Vashchinkina, E., Rajkumar, R., Nutt, D.J., Hyttiä, P., Dawe, G.S., 2015a. Mechanisms of Action and Persistent Neuroplasticity by Drugs of Abuse. *Pharmacol. Rev.* 67, 872–1004. <https://doi.org/10.1124/pr.115.010967>
- Kozela, E., Juknat, A., Vogel, Z., 2017. Modulation of Astrocyte Activity by Cannabidiol, a Nonpsychoactive Cannabinoid. *Int. J. Mol. Sci.* 18. <https://doi.org/10.3390/ijms18081669>
- Kudlacek, O., Hofmaier, T., Luf, A., Mayer, F.P., Stockner, T., Nagy, C., Holy, M., Freissmuth, M., Schmid, R., Sitte, H.H., 2017. Cocaine adulteration. *J. Chem. Neuroanat.* 83–84, 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2017.06.001>
- Kuebler, U., Zuccarella-Hackl, C., Arpagaus, A., Wolf, J.M., Farahmand, F., von Känel, R., Ehlert, U., Wirtz, P.H., 2015. Stress-induced modulation of NF-κB activation, inflammation-associated gene expression, and cytokine levels in blood of healthy men. *Brain. Behav. Immun.* 46, 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.12.024>
- Kumar, V., 2019. Toll-like receptors in the pathogenesis of neuroinflammation. *J. Neuroimmunol.* 332, 16–30. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2019.03.012>
- Kwok, B.H.B., Koh, B., Ndubuisi, M.I., Elofsson, M., Crews, C.M., 2001. The anti-inflammatory natural product parthenolide from the medicinal herb Feverfew directly binds to and inhibits IκB kinase. *Chem. Biol.* 8, 759–766. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(01\)00049-7](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(01)00049-7)

- L -

- Lacagnina, M.J., Rivera, P.D., Bilbo, S.D., 2017. Glial and Neuroimmune Mechanisms as Critical Modulators of Drug Use and Abuse. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 42, 156–177. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.121>
- Lamontagne, S.J., Olmstead, M.C., 2019. Animal models in addiction research: A dimensional approach. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, Addiction: a neurobiological and cognitive brain disorder 106, 91–101. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.06.005>
- LaRowe, S.D., Kalivas, P.W., Nicholas, J.S., Randall, P.K., Mardikian, P.N., Malcolm, R.J., 2013. A double-blind placebo-controlled trial of N-acetylcysteine in the treatment of cocaine dependence. *Am. J. Addict.* 22, 443–452. <https://doi.org/10.1111/j.1521-0391.2013.12034.x>
- LaRowe, S.D., Myrick, H., Hedden, S., Mardikian, P., Saladin, M., McRae, A., Brady, K., Kalivas, P.W., Malcolm, R., 2007. Is cocaine desire reduced by N-acetylcysteine? *Am. J. Psychiatry* 164, 1115–1117. <https://doi.org/10.1176/ajp.2007.164.7.1115>

- Lawrence, T., 2009. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a001651. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001651>
- Lecca, S., Melis, M., Luchicchi, A., Ennas, M.G., Castelli, M.P., Muntoni, A.L., Pistis, M., 2011. Effects of Drugs of Abuse on Putative Rostromedial Tegmental Neurons, Inhibitory Afferents to Midbrain Dopamine Cells. *Neuropsychopharmacology* 36, 589–602. <https://doi.org/10.1038/npp.2010.190>
- Lee, B.R., Ma, Y.-Y., Huang, Y.H., Wang, X., Otaka, M., Ishikawa, M., Neumann, P.A., Graziane, N.M., Brown, T.E., Suska, A., Guo, C., Lobo, M.K., Sesack, S.R., Wolf, M.E., Nestler, E.J., Shaham, Y., Schlüter, O.M., Dong, Y., 2013. Maturation of silent synapses in amygdala-accumbens projection contributes to incubation of cocaine craving. *Nat. Neurosci.* 16, 1644–1651. <https://doi.org/10.1038/nn.3533>
- Lee, J.L.C., Gardner, R.J., Butler, V.J., Everitt, B.J., 2009. D-cycloserine potentiates the reconsolidation of cocaine-associated memories. *Learn. Mem. Cold Spring Harb.* N 16, 82–85. <https://doi.org/10.1101/lm.1186609>
- Lee, J.L.C., Milton, A.L., Everitt, B.J., 2006. Cue-induced cocaine seeking and relapse are reduced by disruption of drug memory reconsolidation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 5881–5887. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0323-06.2006>
- Lepsch, L.B., Munhoz, C.D., Kawamoto, E.M., Yshii, L.M., Lima, L.S., Curi-Boaventura, M.F., Salgado, T.M.L., Curi, R., Planeta, C.S., Scavone, C., 2009. Cocaine induces cell death and activates the transcription nuclear factor kappa-B in PC12 cells. *Mol. Brain* 2, 3. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-2-3>
- LeSage, M.G., Keyler, D.E., Shoeman, D., Raphael, D., Collins, G., Pentel, P.R., 2002. Continuous nicotine infusion reduces nicotine self-administration in rats with 23-h/day access to nicotine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 72, 279–289. [https://doi.org/10.1016/s0091-3057\(01\)00775-4](https://doi.org/10.1016/s0091-3057(01)00775-4)
- Levrán, O., Peles, E., Randesi, M., Correa da Rosa, J., Ott, J., Rotrosen, J., Adelson, M., Kreek, M.J., 2015. Synaptic Plasticity and Signal Transduction Gene Polymorphisms and Vulnerability to Drug Addictions in Populations of European or African Ancestry. *CNS Neurosci. Ther.* 21, 898–904. <https://doi.org/10.1111/cns.12450>
- Lewis, D.J., 1979. Psychobiology of active and inactive memory. *Psychol. Bull.* 86, 1054–1083.
- Lex, A., Hauber, W., 2008. Dopamine D1 and D2 receptors in the nucleus accumbens core and shell mediate Pavlovian-instrumental transfer. *Learn. Mem. Cold Spring Harb.* N 15, 483–491. <https://doi.org/10.1101/lm.978708>
- Li, C.C., Dai, R.M., Chen, E., Longo, D.L., 1994. Phosphorylation of NF-KB1-p50 is involved in NF-kappa B activation and stable DNA binding. *J. Biol. Chem.* 269, 30089–30092.
- Li, Y., Ge, S., Li, N., Chen, L., Zhang, S., Wang, J., Wu, H., Wang, X., Wang, X., 2016. NMDA and dopamine D1 receptors within NAc-shell regulate IEG proteins expression in reward circuit during cocaine memory reconsolidation. *Neuroscience* 315, 45–69. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.11.063>
- Little, K.Y., Ramssen, E., Welchko, R., Volberg, V., Roland, C.J., Cassin, B., 2009. Decreased brain dopamine cell numbers in human cocaine users. *Psychiatry Res.* 168, 173–180. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2008.10.034>
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lonergan, M., Saumier, D., Tremblay, J., Kieffer, B., Brown, T.G., Brunet, A., 2016. Reactivating addiction-related memories under propranolol to reduce craving: A pilot randomized controlled trial. *J. Behav. Ther. Exp. Psychiatry* 50, 245–249. <https://doi.org/10.1016/j.jbtep.2015.09.012>
- Lu, H.-F., Xiao, W., Deng, S.-L., Cheng, X.-L., Zheng, H.-L., Chen, J.-G., Wang, F., 2020. Activation of AMPK-dependent autophagy in the nucleus accumbens opposes cocaine-induced behaviors of mice. *Addict. Biol.* 25, e12736. <https://doi.org/10.1111/adb.12736>

- M -

- Ma, F., Falk, J.L., Lau, C.E., 1999. Cocaine pharmacodynamics after intravenous and oral administration in rats: relation to pharmacokinetics. *Psychopharmacology (Berl.)* 144, 323–332. <https://doi.org/10.1007/s002130051014>
- Ma, Y.-Y., Lee, B.R., Wang, X., Guo, C., Liu, L., Cui, R., Lan, Y., Balcita-Pedicino, J.J., Wolf, M.E., Sesack, S.R., Shaham, Y., Schlüter, O.M., Huang, Y.H., Dong, Y., 2014. Bidirectional modulation of incubation of cocaine craving by silent synapse-based remodeling of prefrontal cortex to accumbens projections. *Neuron* 83, 1453–1467. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.08.023>
- Mattson, M.P., 2005. NF-kappaB in the survival and plasticity of neurons. *Neurochem. Res.* 30, 883–893. <https://doi.org/10.1007/s11064-005-6961-x>
- Meffert, M.K., Baltimore, D., 2005. Physiological functions for brain NF-kappaB. *Trends Neurosci.* 28, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.11.002>

- Misanin, J.R., Miller, R.R., Lewis, D.J., 1968. Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science* 160, 554–555. <https://doi.org/10.1126/science.160.3827.554>
- Missale, C., Nash, S.R., Robinson, S.W., Jaber, M., Caron, M.G., 1998. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol. Rev.* 78, 189–225. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.1.189>
- Mitchell, S., Vargas, J., Hoffmann, A., 2016. Signaling via the NFκB system. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 8, 227–241. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1331>
- Moghaddam, B., Bunney, B.S., 1989. Differential effect of cocaine on extracellular dopamine levels in rat medial prefrontal cortex and nucleus accumbens: comparison to amphetamine. *Synap. N. Y. N* 4, 156–161. <https://doi.org/10.1002/syn.890040209>
- Monfils, M.H., Holmes, E.A., 2018. Memory boundaries: opening a window inspired by reconsolidation to treat anxiety, trauma-related, and addiction disorders. *Lancet Psychiatry* 5, 1032–1042. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(18\)30270-0](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(18)30270-0)
- Moorman, D.E., James, M.H., McGlinchey, E.M., Aston-Jones, G., 2015. Differential roles of medial prefrontal subregions in the regulation of drug seeking. *Brain Res.* 1628, 130–146. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.12.024>
- Moreira, F.P., Medeiros, J.R.C., Lhullier, A.C., Souza, L.D. de M., Jansen, K., Portela, L.V., Lara, D.R., da Silva, R.A., Wiener, C.D., Oses, J.P., 2016. Cocaine abuse and effects in the serum levels of cytokines IL-6 and IL-10. *Drug Alcohol Depend.* 158, 181–185. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2015.11.024>
- Moreno, R., Sobotzik, J.-M., Schultz, C., Schmitz, M.L., 2010. Specification of the NF-κB transcriptional response by p65 phosphorylation and TNF-induced nuclear translocation of IKKε. *Nucleic Acids Res.* 38, 6029–6044. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq439>

- N -

- Nader, K., Schafe, G.E., Le Doux, J.E., 2000. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* 406, 722–726. <https://doi.org/10.1038/35021052>
- Narendran, R., Lopresti, B.J., Mason, N.S., Deutch, L., Paris, J., Himes, M.L., Kodavali, C.V., Nimgaonkar, V.L., 2014. Cocaine abuse in humans is not associated with increased microglial activation: an 18-kDa translocator protein positron emission tomography imaging study with [¹¹C]PBR28. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 34, 9945–9950. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0928-14.2014>
- Nayak, P.K., Misra, A.L., Mulé, S.J., 1976. Physiological disposition and biotransformation of (3H) cocaine in acutely and chronically treated rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 196, 556–569.
- Nennig, S.E., Schank, J.R., 2017. The Role of NFκB in Drug Addiction: Beyond Inflammation. *Alcohol Alcohol. Oxf. Oxf.* 52, 172–179. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agw098>
- Nestler, E.J., 2012. Transcriptional mechanisms of drug addiction. *Clin. Psychopharmacol. Neurosci. Off. Sci. J. Korean Coll. Neuropsychopharmacol.* 10, 136–143. <https://doi.org/10.9758/cpn.2012.10.3.136>
- Northcutt, A.L., Hutchinson, M.R., Wang, X., Baratta, M.V., Hiranita, T., Cochran, T.A., Pomrenze, M.B., Galer, E.L., Kopajtic, T.A., Li, C.M., Amat, J., Larson, G., Cooper, D.C., Huang, Y., O'Neill, C.E., Yin, H., Zahniser, N.R., Katz, J.L., Rice, K.C., Maier, S.F., Bachtell, R.K., Watkins, L.R., 2015. DAT isn't all that: cocaine reward and reinforcement require Toll-like receptor 4 signaling. *Mol. Psychiatry* 20, 1525–1537. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.177>

- O -

- Oeckinghaus, A., Ghosh, S., 2009. The NF-κB Family of Transcription Factors and Its Regulation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000034>
- OFDT (Observatoire Français des Drogues et des Toxicomanies), 2012. POUSET M
- Olds, J., Milner, P., 1954. Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 47, 419–427. <https://doi.org/10.1037/h0058775>

- P -

- Padhye, S., Ahmad, A., Oswal, N., Sarkar, F.H., 2009. Emerging role of Garcinol, the antioxidant chalcone from *Garcinia indica* Choisy and its synthetic analogs. *J. Hematol. Oncol. J. Hematol. Oncol.* 2, 38. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-2-38>

- Pawlowska, E., Szczepanska, J., Wisniewski, K., Tokarz, P., Jaskólski, D.J., Blasiak, J., 2018. NF- κ B-Mediated Inflammation in the Pathogenesis of Intracranial Aneurysm and Subarachnoid Hemorrhage. Does Autophagy Play a Role? *Int. J. Mol. Sci.* 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19041245>
- Periyasamy, P., Liao, K., Kook, Y.H., Niu, F., Callen, S.E., Guo, M.-L., Buch, S., 2018. Cocaine-Mediated Downregulation of miR-124 Activates Microglia by Targeting KLF4 and TLR4 Signaling. *Mol. Neurobiol.* 55, 3196–3210. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0584-5>
- Piechota, M., Korostynski, M., Solecki, W., Gieryk, A., Slezak, M., Bilecki, W., Ziolkowska, B., Kostrzewa, E., Cyerman, I., Swiech, L., Jaworski, J., Przewlocki, R., 2010. The dissection of transcriptional modules regulated by various drugs of abuse in the mouse striatum. *Genome Biol.* 11, R48. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-5-r48>
- Poland, R.S., Hahn, Y., Knapp, P.E., Beardsley, P.M., Bowers, M.S., 2016. Ibudilast attenuates expression of behavioral sensitization to cocaine in male and female rats. *Neuropharmacology* 109, 281–292. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.06.024>
- Pontieri, F.E., Tanda, G., Di Chiara, G., 1995. Intravenous cocaine, morphine, and amphetamine preferentially increase extracellular dopamine in the “shell” as compared with the “core” of the rat nucleus accumbens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 12304–12308. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.26.12304>
- Poon, H.F., Abdullah, L., Mullan, M.A., Mullan, M.J., Crawford, F.C., 2007. Cocaine-induced oxidative stress precedes cell death in human neuronal progenitor cells. *Neurochem. Int.* 50, 69–73. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2006.06.012>
- Prus, A.J., James, J.R., Rosecrans, J.A., 2009. Conditioned Place Preference, in: Buccafusco, J.J. (Ed.), *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*, *Frontiers in Neuroscience*. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton (FL).

- R -

- Ray, L.A., Roche, D.J.O., Heinzerling, K., Shoptaw, S., 2014. Opportunities for the development of neuroimmune therapies in addiction. *Int. Rev. Neurobiol.* 118, 381–401. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801284-0.00012-9>
- Renaud, J., Thérien, H.-M., Plouffe, M., Martinoli, M.-G., 2015. [Neuroinflammation: Dr Jekyll or Mr Hyde?]. *Med. Sci. MS* 31, 979–988. <https://doi.org/10.1051/medsci/20153111012>
- Renthal, W., Maze, I., Krishnan, V., Covington, H.E., Xiao, G., Kumar, A., Russo, S.J., Graham, A., Tsankova, N., Kippin, T.E., Kerstetter, K.A., Neve, R.L., Haggarty, S.J., McKinsey, T.A., Bassel-Duby, R., Olson, E.N., Nestler, E.J., 2007. Histone deacetylase 5 epigenetically controls behavioral adaptations to chronic emotional stimuli. *Neuron* 56, 517–529. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.09.032>
- Rich, M.T., Abbott, T.B., Chung, L., Gulcicek, E.E., Stone, K.L., Colangelo, C.M., Lam, T.T., Nairn, A.C., Taylor, J.R., Torregrossa, M.M., 2016. Phosphoproteomic Analysis Reveals a Novel Mechanism of CaMKII α Regulation Inversely Induced by Cocaine Memory Extinction versus Reconsolidation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 36, 7613–7627. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1108-16.2016>
- Richardson, N.R., Roberts, D.C., 1996. Progressive ratio schedules in drug self-administration studies in rats: a method to evaluate reinforcing efficacy. *J. Neurosci. Methods* 66, 1–11. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(95\)00153-0](https://doi.org/10.1016/0165-0270(95)00153-0)
- Ritz, M.C., Lamb, R.J., Goldberg, S.R., Kuhar, M.J., 1987. Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine. *Science* 237, 1219–1223. <https://doi.org/10.1126/science.2820058>
- Rivest, S., 2009. Regulation of innate immune responses in the brain. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 429–439. <https://doi.org/10.1038/nri2565>
- Robbins, T.W., Everitt, B.J., 1996. Neurobehavioural mechanisms of reward and motivation. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6, 228–236. [https://doi.org/10.1016/s0959-4388\(96\)80077-8](https://doi.org/10.1016/s0959-4388(96)80077-8)
- Roberts, A.J., Koob, G.F., 1997. The Neurobiology of Addiction. *Alcohol Health Res. World* 21, 101–106.
- Rocha, B.A., Fumagalli, F., Gainetdinov, R.R., Jones, S.R., Ator, R., Giros, B., Miller, G.W., Caron, M.G., 1998. Cocaine self-administration in dopamine-transporter knockout mice. *Nat. Neurosci.* 1, 132–137. <https://doi.org/10.1038/381>
- Rojas, A.I., Salinas, M., Martín, D., Perona, R., Cuadrado, A., 2004. Regulation of Cu/Zn-superoxide dismutase expression via the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt pathway and nuclear factor-kappaB. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 7324–7334. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2111-04.2004>

- Romieu, P., Host, L., Gobaille, S., Sandner, G., Aunis, D., Zwiller, J., 2008. Histone deacetylase inhibitors decrease cocaine but not sucrose self-administration in rats. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 9342–9348. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0379-08.2008>
- Rummel, C., Gerstberger, R., Roth, J., Hübschle, T., 2011. Parthenolide attenuates LPS-induced fever, circulating cytokines and markers of brain inflammation in rats. *Cytokine* 56, 739–748. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2011.09.022>
- Russo, S.J., Wilkinson, M.B., Mazei-Robison, M.S., Dietz, D.M., Maze, I., Krishnan, V., Renthal, W., Graham, A., Birnbaum, S.G., Green, T.A., Robison, B., Lesselyong, A., Perrotti, L.I., Bolaños, C.A., Kumar, A., Clark, M.S., Neumaier, J.F., Neve, R.L., Bhakar, A.L., Barker, P.A., Nestler, E.J., 2009. Nuclear factor kappa B signaling regulates neuronal morphology and cocaine reward. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 3529–3537. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6173-08.2009>
- Ryan, M.M., Ryan, B., Kyrke-Smith, M., Logan, B., Tate, W.P., Abraham, W.C., Williams, J.M., 2012. Temporal profiling of gene networks associated with the late phase of long-term potentiation in vivo. *PLoS One* 7, e40538. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040538>

- S -

- Saladin, M.E., Gray, K.M., McRae-Clark, A.L., LaRowe, S.D., Yeatts, S.D., Baker, N.L., Hartwell, K.J., Brady, K.T., 2013. A double blind, placebo-controlled study of the effects of post-retrieval propranolol on reconsolidation of memory for craving and cue reactivity in cocaine dependent humans. *Psychopharmacology (Berl.)* 226, 721–737. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3039-3>
- Salamone, J.D., Pardo, M., Yohn, S.E., López-Cruz, L., SanMiguel, N., Correa, M., 2016. Mesolimbic Dopamine and the Regulation of Motivated Behavior. *Curr. Top. Behav. Neurosci.* 27, 231–257. https://doi.org/10.1007/7854_2015_383
- Salamone, J.D., Wisniecki, A., Carlson, B.B., Correa, M., 2001. Nucleus accumbens dopamine depletions make animals highly sensitive to high fixed ratio requirements but do not impair primary food reinforcement. *Neuroscience* 105, 863–870. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(01\)00249-4](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(01)00249-4)
- Salles, A., Romano, A., Freudenthal, R., 2014. Synaptic NF-kappa B pathway in neuronal plasticity and memory. *J. Physiol. Paris* 108, 256–262. <https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2014.05.002>
- Sanchis-Segura, C., Spanagel, R., 2006. Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. *Addict. Biol.* 11, 2–38. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2006.00012.x>
- Sandrini, M., Cohen, L.G., Censor, N., 2015. Modulating reconsolidation: a link to causal systems-level dynamics of human memories. *Trends Cogn. Sci.* 19, 475–482. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2015.06.002>
- Schneider, H., Pitossi, F., Balschun, D., Wagner, A., del Rey, A., Besedovsky, H.O., 1998. A neuromodulatory role of interleukin-1beta in the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 7778–7783. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.13.7778>
- Schneider-Poetsch, T., Ju, J., Eyler, D.E., Dang, Y., Bhat, S., Merrick, W.C., Green, R., Shen, B., Liu, J.O., 2010. Inhibition of Eukaryotic Translation Elongation by Cycloheximide and Lactimidomycin. *Nat. Chem. Biol.* 6, 209–217. <https://doi.org/10.1038/nchembio.304>
- Schultz, W., 2016. Dopamine reward prediction error coding. *Dialogues Clin. Neurosci.* 18, 23–32.
- Sen, R., Baltimore, D., 1986. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 46, 705–716. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90346-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90346-6)
- Shaham, Y., Shalev, U., Lu, L., de Wit, H., Stewart, J., 2003. The reinstatement model of drug relapse: history, methodology and major findings. *Psychopharmacology (Berl.)* 168, 3–20. <https://doi.org/10.1007/s00213-002-1224-x>
- Sheehan, M., Wong, H.R., Hake, P.W., Malhotra, V., O'Connor, M., Zingarelli, B., 2002. Parthenolide, an Inhibitor of the Nuclear Factor- κ B Pathway, Ameliorates Cardiovascular Derangement and Outcome in Endotoxic Shock in Rodents. *Mol. Pharmacol.* 61, 953–963. <https://doi.org/10.1124/mol.61.5.953>
- Shehata, M., Inokuchi, K., 2014. Does autophagy work in synaptic plasticity and memory? *Rev. Neurosci.* 25, 543–557. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2014-0002>
- Siciliano, C.A., Calipari, E.S., Ferris, M.J., Jones, S.R., 2015. Adaptations of presynaptic dopamine terminals induced by psychostimulant self-administration. *ACS Chem. Neurosci.* 6, 27–36. <https://doi.org/10.1021/cn5002705>
- Sinclair, A.H., Barense, M.D., 2019. Prediction Error and Memory Reactivation: How Incomplete Reminders Drive Reconsolidation. *Trends Neurosci.* 42, 727–739. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2019.08.007>

- Sora, I., Wichems, C., Takahashi, N., Li, X.F., Zeng, Z., Revay, R., Lesch, K.P., Murphy, D.L., Uhl, G.R., 1998. Cocaine reward models: conditioned place preference can be established in dopamine- and in serotonin-transporter knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 7699–7704. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.13.7699>
- Sorg, B.A., 2012. Reconsolidation of drug memories. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 36, 1400–1417. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2012.02.004>
- Sorg, B.A., Todd, R.P., Slaker, M., Churchill, L., 2015. Anisomycin in the medial prefrontal cortex reduces reconsolidation of cocaine-associated memories in the rat self-administration model. *Neuropharmacology* 92, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.12.029>
- Steketee, J.D., Kalivas, P.W., 2011. Drug wanting: behavioral sensitization and relapse to drug-seeking behavior. *Pharmacol. Rev.* 63, 348–365. <https://doi.org/10.1124/pr.109.001933>
- Su, Y., Qu, Y., Zhao, F., Li, H., Mu, D., Li, X., 2015. Regulation of autophagy by the nuclear factor κ B signaling pathway in the hippocampus of rats with sepsis. *J. Neuroinflammation* 12, 116. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0336-2>
- Subramaniam, S.R., Federoff, H.J., 2017. Targeting Microglial Activation States as a Therapeutic Avenue in Parkinson's Disease. *Front. Aging Neurosci.* 9, 176. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00176>
- Suebsasana, S., Pongnaratorn, P., Sattayasai, J., Arkaravichien, T., Tiamkao, S., Aromdee, C., 2009. Analgesic, antipyretic, anti-inflammatory and toxic effects of andrographolide derivatives in experimental animals. *Arch. Pharm. Res.* 32, 1191–1200. <https://doi.org/10.1007/s12272-009-1902-x>

- T -

- Takeuchi, Y., Fukunaga, K., 2003. Differential regulation of NF- κ B, SRE and CRE by dopamine D1 and D2 receptors in transfected NG108-15 cells. *J. Neurochem.* 85, 729–739. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01711.x>
- Tan, W.S.D., Liao, W., Zhou, S., Wong, W.S.F., 2017. Is there a future for andrographolide to be an anti-inflammatory drug? Deciphering its major mechanisms of action. *Biochem. Pharmacol.* 139, 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.03.024>
- Tanda, G., Mereu, M., Hiranita, T., Quarterman, J.C., Coggiano, M., Katz, J.L., 2016. Lack of Specific Involvement of (+)-Naloxone and (+)-Naltrexone on the Reinforcing and Neurochemical Effects of Cocaine and Opioids. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 41, 2772–2781. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.91>
- Taylor, J.R., Olausson, P., Quinn, J.J., Torregrossa, M.M., 2009. Targeting extinction and reconsolidation mechanisms to combat the impact of drug cues on addiction. *Neuropharmacology* 56 Suppl 1, 186–195. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.07.027>
- Torregrossa, M.M., MacDonald, M., Stone, K.L., Lam, T.T., Nairn, A.C., Taylor, J.R., 2019. Phosphoproteomic analysis of cocaine memory extinction and reconsolidation in the nucleus accumbens. *Psychopharmacology (Berl.)* 236, 531–543. <https://doi.org/10.1007/s00213-018-5071-9>
- Torregrossa, M.M., Sanchez, H., Taylor, J.R., 2010. D-cycloserine reduces the context specificity of pavlovian extinction of cocaine cues through actions in the nucleus accumbens. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 10526–10533. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2523-10.2010>
- Torregrossa, M.M., Taylor, J.R., 2016. Neuroscience of learning and memory for addiction medicine: from habit formation to memory reconsolidation. *Prog. Brain Res.* 223, 91–113. <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2015.07.006>
- Torres, G.E., 2006. The dopamine transporter proteome. *J. Neurochem.* 97 Suppl 1, 3–10. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03719.x>
- Tronel, S., Milekic, M.H., Alberini, C.M., 2005. Linking New Information to a Reactivated Memory Requires Consolidation and Not Reconsolidation Mechanisms. *PLoS Biol.* 3. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030293>
- Tronson, N.C., Taylor, J.R., 2007. Molecular mechanisms of memory reconsolidation. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 262–275. <https://doi.org/10.1038/nrn2090>
- Tzschentke, T.M., 2007. Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addict. Biol.* 12, 227–462. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2007.00070.x>

- V -

- Vallender, E.J., Goswami, D.B., Shinday, N.M., Westmoreland, S.V., Yao, W.-D., Rowlett, J.K., 2017. Transcriptomic profiling of the ventral tegmental area and nucleus accumbens in rhesus macaques following long-term cocaine self-administration. *Drug Alcohol Depend.* 175, 9–23. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2017.01.030>
- Vaz, A., Lefkowitz, S.S., Castro, A., Lefkowitz, D.L., 1994. The effects of cocaine and its metabolites on the production of reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates. *Life Sci.* 55, PL439-444. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(94\)00348-3](https://doi.org/10.1016/0024-3205(94)00348-3)
- Verstrepen, L., Bekaert, T., Chau, T.-L., Tavernier, J., Chariot, A., Beyaert, R., 2008. TLR-4, IL-1R and TNF-R signaling to NF-kappaB: variations on a common theme. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 65, 2964–2978. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8064-8>
- Villain, H., Florian, C., Roullet, P., 2016. HDAC inhibition promotes both initial consolidation and reconsolidation of spatial memory in mice. *Sci. Rep.* 6, 27015. <https://doi.org/10.1038/srep27015>
- Volkow, N.D., Koob, G.F., McLellan, A.T., 2016. Neurobiologic Advances from the Brain Disease Model of Addiction. *N. Engl. J. Med.* 374, 363–371. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1511480>
- Volkow, N.D., Wang, G.J., Fischman, M.W., Foltin, R.W., Fowler, J.S., Abumrad, N.N., Vitkun, S., Logan, J., Gatley, S.J., Pappas, N., Hitzemann, R., Shea, C.E., 1997. Relationship between subjective effects of cocaine and dopamine transporter occupancy. *Nature* 386, 827–830. <https://doi.org/10.1038/386827a0>
- Volkow, N.D., Wang, G.-J., Fowler, J.S., Thanos, P.P.K., Logan, J., Gatley, S.J., Gifford, A., Ding, Y.-S., Wong, C., Pappas, N., Thanos, P., 2002. Brain DA D2 receptors predict reinforcing effects of stimulants in humans: replication study. *Synap. N. Y. N* 46, 79–82. <https://doi.org/10.1002/syn.10137>
- Vousden, G.H., Milton, A.L., 2017. The chains of habits: too strong to be broken by reconsolidation blockade? *Curr. Opin. Behav. Sci., Addiction* 13, 158–163. <https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2016.11.010>

- W -

- Wan, F., Lenardo, M.J., 2009. Specification of DNA binding activity of NF-kappaB proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a000067. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000067>
- Wassum, K.M., Izquierdo, A., 2015. The basolateral amygdala in reward learning and addiction. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 57, 271–283. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.08.017>
- Wassum, K.M., Ostlund, S.B., Loewinger, G.C., Maidment, N.T., 2013. Phasic mesolimbic dopamine release tracks reward seeking during expression of Pavlovian-to-instrumental transfer. *Biol. Psychiatry* 73, 747–755. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.12.005>
- Wells, A.M., Lasseter, H.C., Xie, X., Cowhey, K.E., Reittinger, A.M., Fuchs, R.A., 2011. Interaction between the basolateral amygdala and dorsal hippocampus is critical for cocaine memory reconsolidation and subsequent drug context-induced cocaine-seeking behavior in rats. *Learn. Mem. Cold Spring Harb. N* 18, 693–702. <https://doi.org/10.1101/lm.227311>
- Wise, R.A., Newton, P., Leeb, K., Burnette, B., Pocock, D., Justice, J.B., 1995. Fluctuations in nucleus accumbens dopamine concentration during intravenous cocaine self-administration in rats. *Psychopharmacology (Berl.)* 120, 10–20. <https://doi.org/10.1007/BF02246140>
- Wise, R.A., Wang, B., You, Z.-B., 2008. Cocaine Serves as a Peripheral Interoceptive Conditioned Stimulus for Central Glutamate and Dopamine Release. *PLoS ONE* 3. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002846>
- World Drug Report 2020 (United Nations publication, Sales No. E.20.XI.6).
- Wright, W.J., Graziane, N.M., Neumann, P.A., Hamilton, P.J., Cates, H.M., Fuerst, L., Spenceley, A., MacKinnon-Booth, N., Iyer, K., Huang, Y.H., Shaham, Y., Schlüter, O.M., Nestler, E.J., Dong, Y., 2020. Silent synapses dictate cocaine memory destabilization and reconsolidation. *Nat. Neurosci.* 23, 32–46. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0537-6>

- X -

- Xia, Y.-F., Ye, B.-Q., Li, Y.-D., Wang, J.-G., He, X.-J., Lin, X., Yao, X., Ma, D., Slungaard, A., Hebbel, R.P., Key, N.S., Geng, J.-G., 2004. Andrographolide attenuates inflammation by inhibition of NF-kappa B activation through covalent modification of reduced cysteine 62 of p50. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 173, 4207–4217. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.6.4207>

- Xie, X., Jhaveri, K.A., Ding, M., Hughes, L.F., Toth, L.A., Ramkumar, V., 2007. Expression of striatal adenosine and dopamine receptors in mice deficient in the p50 subunit of NF- κ B. *Life Sci.* 81, 1031–1041. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.07.031>
- Xu, R., Serritella, A.V., Sen, T., Farook, J.M., Sedlak, T.W., Baraban, J., Snyder, S.H., Sen, N., 2013. Behavioral effects of cocaine mediated by nitric oxide-GAPDH transcriptional signaling. *Neuron* 78, 623–630. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.03.021>

- Y -

- Yang, H., Wang, J., Ou, X., Huang, Z.Z., Lu, S.C., 2001. Cloning and analysis of the rat glutamate-cysteine ligase modifier subunit promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285, 476–482. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5190>
- Yang, J., Yu, J., Jia, X., Zhu, W., Zhao, L., Li, S., Xu, C., Yang, C., Wu, P., Lu, L., 2011. Inhibition of nuclear factor- κ B impairs reconsolidation of morphine reward memory in rats. *Behav. Brain Res.* 216, 592–596. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.08.047>
- Yirmiya, R., Goshen, I., 2011. Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. *Brain. Behav. Immun.* 25, 181–213. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.10.015>
- Yu, Z., Zhou, D., Bruce-Keller, A.J., Kindy, M.S., Mattson, M.P., 1999. Lack of the p50 subunit of nuclear factor- κ B increases the vulnerability of hippocampal neurons to excitotoxic injury. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, 8856–8865.

- Z -

- Zhu, H., Zhou, Y., Liu, Z., Chen, X., Li, Y., Liu, X., Ma, L., 2018a. β 1-Adrenoceptor in the Central Amygdala Is Required for Unconditioned Stimulus-Induced Drug Memory Reconsolidation. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 21, 267–280. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyx104>
- Zhu, R., Bu, Q., Fu, D., Shao, X., Jiang, L., Guo, W., Chen, B., Liu, B., Hu, Z., Tian, J., Zhao, Y., Cen, X., 2018b. Toll-like receptor 3 modulates the behavioral effects of cocaine in mice. *J. Neuroinflammation* 15, 93. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1130-8>

Caroline CORREIA

Etudes de l'implication des voies liées à la neuroinflammation dans le comportement d'auto-administration de cocaïne

Résumé

Il est établi depuis plusieurs années que la consommation de cocaïne est à l'origine de nombreuses adaptations cérébrales. En particulier, l'exposition à la cocaïne augmente l'expression de plusieurs marqueurs neuroinflammatoires. Mon travail de thèse, basé sur l'utilisation d'un modèle d'auto-administration de cocaïne par voie intraveineuse chez le Rat, m'a permis d'explorer l'implication du NFκB, un facteur de transcription traditionnellement mis en jeu dans la neuroinflammation, dans la consommation de drogue. Nous avons montré que la consommation de cocaïne augmente le niveau de phosphorylation de la sous-unité p65 du NFκB dans certaines régions cérébrales, reflétant l'activation de cette voie. En retour, dans nos conditions expérimentales, l'inhibition pharmacologique de l'activation de NFκB augmente la consommation de cocaïne et la motivation des animaux pour la drogue. En plus de son implication dans l'inflammation, le NFκB est connu pour jouer un rôle important dans des processus d'apprentissage et de mémoire. Or, la mise en place de souvenirs persistants joue un rôle clé dans la dépendance aux drogues, et la mémoire des indices associés à la drogue contribue à maintenir une consommation compulsive de drogues, notamment parce que ce sont de puissants déclencheurs de rechute. Nous avons étudié l'implication du NFκB dans les souvenirs liés à la cocaïne. Nous avons constaté que l'injection systémique d'inhibiteurs du NFκB, l'andrographolide ou le parthénolide, juste après le rappel des indices associés à la cocaïne, réduisait significativement le comportement de recherche de cocaïne. Nos résultats suggèrent que NFκB intervient dans le processus mnésique de reconsolidation. Dans l'ensemble, nos résultats proposent une dualité de l'implication du NFκB dans la dépendance à la cocaïne. Ce facteur limiterait la consommation de cocaïne et, en revanche, participerait à la force de la mémoire des signaux associés à la consommation de la drogue. Nos travaux contribuent ainsi à une meilleure compréhension du rôle du NFκB dans la consommation de drogue et des mécanismes activés lors de la reconsolidation, et pourraient ainsi ouvrir de nouvelles pistes de recherche thérapeutique pour diminuer les risques de rechute dans la consommation de cocaïne.

Mots clefs : Cocaïne, Neuroinflammation, NFκB, Mémoire, Reconsolidation, Réinstallation

Summary

It has been established for several years that cocaine use induces many brain adaptations. In particular, cocaine intake increases the expression of several neuroinflammatory markers. My thesis work, based on a rat model of intravenous cocaine self-administration, allowed me to explore the role of NFκB, a transcription factor involved in neuroinflammation, in cocaine use. We have shown that cocaine consumption increases the level of phosphorylation of the p65 subunit of NFκB in specific brain regions, reflecting activation of this pathway. Furthermore, the pharmacological inhibition of the activation of NFκB increases both cocaine consumption and motivation for the drug, in our model. In addition to its involvement in inflammation, NFκB is known to participate in learning and memory processes. Moreover, persistent memories play a key role in drug-related disorders and memory for drug-paired cues contributes in sustaining compulsive drug use, as these are notably potent triggers of relapse. We studied the involvement of NFκB in these memory processes. We found that systemic injection of NFκB inhibitors, andrographolide or parthenolide, just after the recall of cocaine-associated cues, significantly reduced cocaine-seeking behavior. Our results suggest that NFκB is involved in the mnesic process of reconsolidation. Overall, our results propose a duality in the involvement of NFκB in cocaine addiction. It would limit cocaine consumption and, in contrast, would participate in the strength of the memory of cocaine associated cues. Our work is thus contributing to a better understanding of the role of NFB in drug use and the mechanisms activated during reconsolidation and could thus open new avenues of therapeutic research to decrease risk of relapse to cocaine use.

Keywords: Cocaine, Neuroinflammation, NFκB, Memory, Reconsolidation, Reinstatement