Université Bordeaux Segalen

Année 2011 Thèse N° 1856

THÈSE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX II

Mention : Sciences de la Vie et de la Santé
Option : Neurosciences

Présentée et soutenue publiquement le 16 décembre 2011

par

Amélie SIMONNET

Née le 20 juillet 1984 à Bordeaux (Gironde)

IMPLICATION DU SYSTEME ENDOCANNABINOÏDE DANS LA DEPENDANCE A LA NICOTINE

Membres du Jury

Prof. Muriel DARNAUDÉRY, CNRS UMR 5226, Bordeaux	Présidente
Prof. Catherine BELZUNG, INSERM U930, Tours	Rapporteur
Prof. Rafael MALDONADO, Universitat Pompeu Fabra, Barcelone	Rapporteur
Dr Stéphanie CAILLÉ, CNRS UMR 5287, Bordeaux	Directrice de thèse

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été réalisé dans l'équipe de « Neuropsychopharmacologie de l'addiction » dirigée par Madame le Docteur **Martine Cador**, au sein de l'UMR5287, dirigée par Monsieur le Docteur **Jean-René Cazalets**, auxquels j'adresse ma reconnaissance pour m'avoir accueillie et m'avoir ainsi permis de réaliser ce travail.

Je remercie Madame le Professeur **Murielle Darnaudéry** qui me fait l'honneur de présider le jury de cette thèse.

J'exprime toute ma gratitude à Madame le Professeur **Catherine Belzung** et Monsieur le Professeur **Rafael Maldonado** pour avoir accepté de faire le rapport de ce travail et pour le temps qu'ils y ont consacré.

Je remercie Madame le Docteur **Marie-Pierre Moisan** de m'avoir permis de réaliser les dosages de corticostérone au sein du laboratoire de Nutrition et Neurobiologie intégrée (NutriNeuro, INRA UMR1286). Un grand merci à **Amandine Minni**, pour m'avoir initié à la technique du dosage de corticostérone.

Je tiens à exprimer ma sincère gratitude à Madame le Docteur **Stéphanie Caillé** qui a dirigé l'ensemble de ce travail. Sois assurée, de toute ma reconnaissance pour m'avoir fait confiance et donné la chance de réaliser cette thèse. Merci pour ta grande disponibilité, ta constante bonne humeur, ta rigueur et tes compétences scientifiques. Ces années passées sous ta direction auront été extrêmement enrichissantes tant sur le plan scientifique que sur le plan humain. Merci.

Je remercie Anne et Stéphane pour le soin qu'ils ont apporté à mes petits rats.

Merci à Pierrot, Alain, Marie-Hélène pour le travail qu'ils mènent au sein du laboratoire et les moments de convivialité partagés lors des pauses café !!

De façon générale, je souhaite remercier tous les membres du laboratoire : Martine, Catherine, Françoise, Serge, Angelo, Karine, Cyril, Sabira et l'ensemble des personnes que j'ai eu la chance de rencontrer au cours de ma thèse : Anne-Ruth, Aurélie, Émilie, Maryline, Michel, Kelly, Marion, Aliou, Éric, Claudia, Prisca, Nathalie, Aurélien, Magalie, Lauriane, Marion, Leandro, Jana, Ronald, , Carmen, Julia, Amandine.

Un grand merci aux amis de labo qui ont su rendre ces années de thèse inoubliables !!

Dank je wel Anne-Rut pour la découverte du gourmetten, les sessions footing (enfin quand il ne pleut pas, quand il fait pas trop froid et quand on est pas trop fatigué !) et les surprises du food drawer ! Je te souhaite bonne chance pour la continuation de ta thèse !

Merci à vous, Emilie et Aurélie de ne **pô** être tout à fait des personnes comme tout le monde !!! Merci pour les moments de détentes partagés et les soirées « décompression» au Saint Aubin.

Ces années de thèses auront aussi été marqué par mes amies Neuroscientists docteurs en devenir Marion, Mathilde et Aurore merci les filles pour votre écoute et pour tous les bons moments partagés depuis le master (les pique-niques sur les quais, les soirées korsy, les tequila de San Diego…).

Je remercie également les copains de Bordeaux : Ben et Aurélie (les bicounets : vos gâteaux crus nous manquent déjà !!), Benoît, Fifou, Mich-Mich, Vincent, Pierrick, Antoine, David, Gaëlle, Sarah, et mes amis de longue date Marion, Pauline, Manu, Lauren, Virginie, Arnaud, Jenyfair, Julie pour tous les moments inoubliables passés ensemble !!

Merci à toi Nico d'avoir été présent ces trois dernières années et de m'avoir soutenue ces dernières semaines. Mon sac à dos est prêt, il ne reste plus qu'à choisir une destination !!!

Bien évidemment, un grand merci à ma famille : à ma grand–mère, à ma sœur et à mes parents qui ont toujours cru en moi et qui ont su me soutenir tout le long de mes années d'étude.

Résumé, Abstract

Résumé

Le système endocannabinoïde (SEC) est composé : de deux neurotransmetteurs principaux qui sont l'anandamide (AEA) et le 2-arachidonoylglycerol (2-AG), de deux enzymes de catabolisme associées, respectivement la Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH) et la Monoacylglycerol Lipase (MAGL); et de deux récepteurs principaux qui sont les récepteurs cannabinoïdes de type 1 (CB1) et de type 2 (CB2). Le SEC exerce un rôle critique dans le contrôle des propriétés récompensantes des substances addictives, dont la nicotine. Cependant, le SEC possède un mode de fonctionnement biphasique et complexe. Par exemple, alors que les propriétés renforçantes et incitatrices de la nicotine sont diminuées par le blocage *aigu* des récepteurs CB1, le comportement de recherche de nicotine peut également être bloqué par l'augmentation *aigüe* du tonus endocannabinoïde (eCB). Par ailleurs, les essais cliniques suggèrent que le traitement *chronique* avec l'antagoniste des récepteurs CB1 produit des effets secondaires liés à l'état émotionnel des fumeurs abstinents. Ces résultats indiquent clairement, que l'utilisation optimale de la pharmacologie cannabinoïde pour le traitement *chronique* du sevrage tabagique reste compliquée et encore mal maitrisée. Le but de ce travail de thèse était d'abord de préciser le rôle des récepteurs CB1 dans le contrôle *aigu* des propriétés addictives de la nicotine, puis de déterminer le rôle de l'AEA dans le contrôle *à long terme* des propriétés incitatives de la nicotine. **L'hypothèse générale** était que la prise volontaire de nicotine, puis le traitement *chronique* avec un inhibiteur de la FAAH, produiraient une augmentation de l'AEA persistante chez le rat abstinent. Celle-ci aurait 2 conséquences : d'une part la réduction du comportement de recherche de nicotine, et d'autre part le développement d'un état anxieux généralisé indépendant de la transmission via les récepteurs CB1. Pour tester cette hypothèse, des rats ont été exposés à l'auto-administration intraveineuse de nicotine pendant 8 semaines puis mis en abstinence pendant 8 semaines. Pendant cette seconde période, les animaux ont été injectés quotidiennement avec un inhibiteur de la FAAH et nous avons caractérisé le comportement de recherche de nicotine et l'état émotionnel de ces rats. Les résultats ont d'abord montré une grande variabilité inter-individuelle dans la prise volontaire de nicotine, nous avons pu identifier des rats à faible consommation (« low consumers ») et des rats à forte consommation (« high consumers »). Il semble que l'inhibition chronique de la FAAH bloque significativement la rechute induite par la drogue et par les stimuli environnementaux chez les « low consumers » abstinents, et reste sans conséquence sur l'état émotionnel des rats. En revanche chez les « high consumers », l'inhibition de la FAAH bloque uniquement la rechute induite par la nicotine et ces animaux restent sensibles aux effets précipitants des stimuli environnementaux. Par ailleurs, ils développent un état anxieux modéré qui n'est pas bloqué par le traitement avec un antagoniste des récepteurs CB1. Ces données suggèrent donc que chez les « high consumers » abstinents, il existe un excès d'AEA qui cible des circuits différents pour moduler les propriétés incitatrices de la nicotine et l'anxiété. En conclusion, cette étude montre que l'inhibiteur de FAAH pourrait être un outil thérapeutique adapté au traitement de l'addiction à la nicotine si l'on prend en compte la variabilité inter-individuelle rencontrée dans la consommation abusive de nicotine.

Mots clé : Nicotine, Auto-administration intraveineuse, Anxiété, Dépression, Récepteur CB1, Anandamide

Abstract

The endogenous cannabinoid system, also called the endocannabinoid system (ECS), comprises two principal neurotransmitters: anandamide (AEA) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG), whose specific degradation enzymes are fatty acid amide hydrolase (FAAH) and monoacylglycerol lipase (MAGL), respectively. Both AEA and 2-AG bind to cannabinoid type 1 (CB1) and cannabinoid type 2 (CB2) receptors. The ECS is a key element for the expression of both natural and pharmacological reward processes, including nicotine reward. However, the biphasic and complex nature of the ECS renders it a difficult system to study. For example, although acute blockade of CB1 receptors reduces the reinforcing and incentive properties of nicotine, it has also been demonstrated that an acute increase of AEA (CB1 agonist) blocks nicotine-seeking behavior. The aim of the present work is twofold: first, to better characterize the neural substrates through which CB1 receptors regulate the voluntary intake of nicotine; and second, to determine the effect of a chronic increase of AEA tone in nicotine-abstinent rats on i) their persistent motivation for nicotine and ii) their affective phenotype. **The hypothesis tested here** is that chronic treatment with a FAAH inhibitor after chronic exposure to nicotine will induce a large and persistent increase of AEA during a period of nicotine abstinence. Subsequently, high levels of AEA would reduce the incentive properties of nicotine and nicotine-related stimuli, thus reducing nicotine seeking, and it would also promote high levels of anxiety which might be CB1-independent. In order to test this hypothesis, rats were exposed to nicotine (60 µg/kg/0.1 ml) intravenous self-administration (IVSA) for 8 weeks, after which they remained nicotine-free until the end of the experiment. During the period of abstinence, animals were injected daily with a FAAH inhibitor for 8 weeks (URB597, 0.3 mg/kg i.p.), and both their motivation for nicotine and their affective profile were assessed. Animals were classified into “low consumers” and “high consumers” since a high degree of inter-individual variability was observed in the total amount of nicotine taken over the 8-week IVSA period. We show that in the “low consumers”, chronic FAAH inhibition dramatically reduces nicotine seeking behavior and cue-related incentive salience, and does not induce anxiety-related side-effects during abstinence. In the “high consumers”, however, chronic FAAH inhibition reduces nicotine seeking but not cue-related incentive salience, and causes an increase in anxiety-like behaviors that are not blocked by a CB1 receptor antagonist. These data suggest that in the population of “high consumers”, the effects of increased AEA tone on motivation and anxiety might be mediated by different neuronal circuits. In conclusion, this study demonstrates the potential of chronic FAAH inhibition as an important therapeutic tool for the treatment of nicotine addiction in subjects with a moderate nicotine intake.

Keywords: Nicotine, Intravenous self-administration, Anxiety, Depression, CB1 receptor, Anandamide

LISTE DE PUBLICATIONS

- **Articles pour publications**

Simonnet A., Cador M. and Caille S. Nicotine reinforcement is reduced by cannabinoid CB1 receptor blockade in the ventral tegmental area. (*Soumission*)

Simonnet A and Caille S. Anxiogenic effects of chronic fatty acid amide hydrolase inhibitor on nicotine abstinent rats: behavioral and neurobiological correlates. (*En preparation*)

- **Communications affichées à des congrès nationaux ou internationaux**

Simonnet A, Cador M and Caille S (2009) The Cannabinoid type 1 receptors located in the ventral tegmental area modulate the reinforcing properties of Nicotine. 9e colloque de la Société des Neurosciences, Bordeaux, France, 26-29 mai

Simonnet A, Cador M and Caille S (2010) Identification of neuronal structure involved in the Cannabinoid type 1 receptors modulation of the reinforcing properties of Nicotine. 40th Annual meeting of the Society for Neuroscience, San Diego (CA), USA, November 13-16

Simonnet A and Caille S (2011) Anxiogenic and depressive-like effects of chronic fatty acid amide hydrolase inhibitor on nicotine abstinent rats. Gordon Research Conference "Cannabinoid Function in the CNS", Les Diablerets, Switzerland, May 22-27

- **Communications affichées à la journée scientifique de l'Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé**

Simonnet A, Cador M and Caille S (2010) Contrôle des propriétés renforçantes de la nicotine par les récepteurs cannabinoïdes de type 1 : quelles sont les structures cérébrales impliquées? Journée de l'Ecole Doctorale, Arcachon, France, 28 avril

Simonnet A and Caille S (2011) Anxiogenic and depressive-like effects of fatty acid amide hydrolase inhibitor in nicotine abstinent rats. Journée de l'Ecole Doctorale, Arcachon, France, 7 avril

Table des matières

Résumé, Abstract
INDEX DES FIGURES 1
ABREVIATIONS 3
INTRODUCTION 5
I. Le système endocannabinoïde 6
I.A. Historique 6
I.B. Les récepteurs aux cannabinoïdes 7
I.B.1. Le récepteur CB1 7
I.B.1.a Localisation 7
I.B.2. Le récepteur CB2 8
I.B.3. Voie de transduction associée aux récepteurs CB1 et CB2 8
I.C. Les cannabinoïdes endogènes ou endocannabinoïdes. 10
I.C.1. L'anandamide 10
I.C.2. Le 2 arachidonyl-glycerol 11
I.C.3. Métabolisme des endocannabinoïdes 12
I.C.4. Autres molécules appartenant à la famille des endocannabinoïdes 14
I.C.4.a Palmotoylethanolamide (PEA) et Oleoylethanolamide (OEA) 14
I.C.4.b Noladine éther (2-arachidonoyl glyceryl ether) 15
I.C.4.c Virodhamine (O-arachidonoyl ethanolamine) 15
I.C.4.d N-arachidonyl-dopamine (NADA). 16
I.D. Le système endocannabinoïde : un système au mode de fonctionnement biphasique, impliqué dans de nombreux comportements. 17
I.D.1. La tétrade cannabinoïde 17
I.D.2. Endocannabinoïdes et mémoire 18
I.D.3. Endocannabinoïdes et prise alimentaire 18
I.D.4. Endocannabinoïdes et emotions 20
I.D.4.a Endocannabinoïdes et anxiété 20
I.D.4.b Endocannabinoïdes et dépression 22
I.E. Contrôle des propriétés renforçantes des récompenses naturelles et pharmacologiques par le système endocannabinoïde. 24
I.E.1. Présentation du système de récompense 24
I.F. Récompense naturelle : la nourriture 26
I.F.1. Récompenses pharmacologiques : les drogues d'abus 27

I.F.1.a Opiacés *27*
I.F.1.b Alcool *28*
I.F.1.c La cocaïne *29*
I.G. Les récepteurs CB1, une cible thérapeutique pour l'abus de récompenses naturelles et pharmacologiques 30
I.G.1. Approche directe : Inhibition des récepteurs CB1 30
I.G.2. Approche indirecte : augmentation du tonus eCB 31
I.G.2.a Inhibition du transporteur membranaire *31*
I.G.2.b Inhibition de la dégradation *32*
II. Implication du système endocannabinoïde dans le contrôle de la dépendance tabagique 33
II.A. La nicotine 33
II.A.1. Les récepteurs nicotiniques 33
II.A.2. Localisation des récepteurs nicotiniques au sein du Système Nerveux Central 35
II.A.3. Rôle des différentes sous-unités du nAChR dans les effets renforçants de la nicotine 36
II.A.4. Effet de l'exposition à la nicotine sur les récepteurs nACh 37
II.A.5. Effet de la nicotine sur le système de récompense 37
II.B. Addiction à la nicotine 38
II.B.1. L'étude de la dépendance à la nicotine chez l'homme 38
II.B.2. Modèles animaux de dépendance à la nicotine 38
II.B.2.a Avantages du modèle d'auto-administration intraveineuse de drogue *39*
II.B.2.b Limites du modèle d'auto-administration intraveineuse de drogue *40*
II.B.2.c Les différentes procédures dans le modèle d'AAIV de drogue pour évaluer les étapes du processus de l'addiction à la nicotine *41*
II.C. Interaction entre système endocannabinoïde et système nicotinique. 42
II.C.1. Le système endocannabinoïde et l'addiction à la nicotine 42
II.C.1.a Le système endocannabinoïde et les effets renforçants de la nicotine *42*
II.C.1.b Le système endocannabinoïde et les effets motivationnels de la nicotine *43*
II.C.2. Le système endocannabinoïde et les réponses émotionnelles induites par la nicotine 44
III. Objectifs de la thèse 45

MATÉRIEL & MÉTHODES 48

I. Animaux et conditions d'élevage 49

II. Drogues 49

II.A. Nicotine 49
II.B. Pharmacologie cannabinoïde 49

II.B.1. Antagoniste des récepteurs CB1 : l'AM251 [1-(2,4-dichlorophenyl)-5-(4-iodophenyl)-4-methyl-N-(1-piperidyl) pyrazole-3-carboxamide. 49

II.B.2. Inhibiteur de l'enzyme de dégradation de l'anandamide : l'URB59 [3-(3-carbamoylphenyl)phenyl] N-cyclohexylcarbamate. 50

III. Intoxication à la nicotine 50

III.A. Auto-administration intraveineuse 50

III.A.1. Chirurgie : cathétérisation de la veine jugulaire 50

III.A.1.a Dispositif expérimental 50
III.A.1.b Principe expérimental 51
III.A.1.c Mesure de la motivation persistante pour la drogue 51

III.A.1.c.(i) Rechute induite par la drogue 52
III.A.1.c.(ii) Rechute induite par présentation d'un stimulus lumineux 52

III.B. Exposition chronique à la nicotine par injections sous-cutanées 52
III.C. Auto-administration orale d'eau 52

III.C.1. Dispositif expérimental 52
III.C.2. Principe expérimental 53

IV. Injections intracérébrales 53

IV.A. Implantation des canules-guide intracérébrales 53
IV.B. Procédure expérimentale 53

V. Mesures comportementales de l'anxiété 54

V.A. Test du labyrinthe en croix surélevé (Elevated Plus Maze, EPM) 54
V.B. Test d'hypophagie induite par la nouveauté (Novelty supressed feeding, NSF). 55
V.C. Test d'interaction sociale 56

VI. Mesure de l'état dépressif 57

VI.A. Test de la nage forcée (Test de Posolt) 57
VI.B. La préférence pour le sucrose 58

VII. Activité locomotrice 58

VII.A. Les cages d'activité 58
VII.B. Test du tapis roulant ou « Treadmill » 59
VIII. Marqueurs biologiques 60
VIII.A. Dosage des taux sanguins de corticostérone 60
VIII.A.1. Prélèvements sanguins 60
VIII.A.2. Dosage radio immunologique de la corticostérone plasmatique 61
IX. Analyses statistiques 61
PARTIE 1 : Identification des structures cérébrales impliquées dans la diminution des propriétés renforçantes de la nicotine par les antagonistes CB1 63
I. Introduction 64
II. Matériels et Méthodes 66
II.A. Protocole expérimental 66
II.B. Analyses Statistiques 67
III. Résultats 68
III.A. Effet d'une injection systémique d'un antagoniste CB1 sur la prise de nicotine 68
III.B. Identifications des structures spécifiquement impliquées dans les effets des antagonistes CB1 sur la consommation de nicotine 69
III.B.1. Aire tegmentale ventrale 69
III.B.2. Noyau Accumbens 70
III.B.3. Noyau du lit de la strie terminale 71
III.C. Spécificité de l'effet d'une injection intra-ATV de l'antagoniste CB1 72
IV. Conclusions et discussion 74
Article 76
PARTIE 2 : Effet de l'augmentation chronique de l'anandamide sur les propriétés incitatives de la nicotine, des stimuli associés à sa prise et sur le phénotype émotionnel des rats abstinents 77
I. Introduction 78
II. Protocoles expérimentaux 81

II.A. Histoire pharmacologique des animaux 81
II.B. Effet du sevrage de la nicotine 82
II.C. Mesure des propriétés incitatives de la nicotine et des stimuli associés à la prise de nicotine dans le comportement de recherche de nicotine chez le rat abstinent à long terme.82
II.D. Caractérisation du phénotype émotionnel : composantes comportementales et endocriniennes 83
II.D.1. Profil « anxieux » 83
II.D.2. Profil « dépressif » 84
II.D.3. Analyse des marqueurs biologiques 85
II.D.3.a Mesure de la réponse de l'axe HPA en situation de stress de contention 85
II.D.3.b Effet du traitement chronique à l'enzyme de dégradation de l'AEA sur les récepteurs CB1 85
II.E. Analyses statistiques 85
III. Résultats : 88
III.A. Consommation volontaire de nicotine. 88
III.B. L'inhibition chronique de l'enzyme de dégradation de l'AEA diminue la recherche de nicotine chez les rats abstinents 90
III.B.1. L'URB597 bloque la rechute induite par l'exposition à la nicotine quelle que soit la consommation initiale de nicotine 90
III.B.2. L'URB597 diminue la rechute induite par la présentation du stimulus associé à la prise de nicotine 91
III.C. L'inhibition chronique de l'enzyme de dégradation de l'AEA induit un état d'anxiété chez les rats abstinents ayant eu une forte consommation de nicotine 93
III.C.1. Mesure de l'anxiété en condition basale 93
III.C.2. Mesure de l'anxiété suite à un stress modéré 95
III.C.2.a Hyphophagie induite par la nouveauté 95
III.C.2.b Analyses corrélationnelles 96
III.C.3. Mesure de l'état d'anxiété en condition de stress social 98
III.C.4. Rôle des récepteurs CB1 dans les effets pro-anxieux induits par l'inhibition de l'enzyme de dégradation de l'AEA chez les rats abstinents 100
III.D. Effet de l'inhibition chronique de l'enzyme de dégradation de l'AEA sur les différentes composantes comportementales d'un état dépressif 102
III.D.1. Mesure de l'état de résignation : 102
III.D.2. Mesure de l'anhédonie : 103
III.D.3. Mesure de l'activité locomotrice 105

III.D.4. Effet de l'inhibition chronique de l'enzyme de dégradation de l'AEA sur la résistance à l'effort 106

III.E. Analyse des biomarqueurs 107

III.E.1. Dosage de la corticostérone plasmatique : 107

III.E.2. Effet du traitement chronique à l'enzyme de dégradation de l'AEA sur les récepteurs CB1 109

IV. Conclusions et Discussion 110

IV.A. L'AAIV de nicotine : un modèle de consommation volontaire et chronique de nicotine permettant la mise en évidence de variabilités interindividuelles. 110

IV.B. L'inhibition chronique de l'enzyme de dégradation de l'AEA : un traitement efficace pour bloquer le rechute à très long terme. 111

IV.C. Effet de l'inhibition chronique de l'enzyme de dégradation de l'AEA chez des rats naïfs : pas de modification de l'état émotionnel 111

IV.D. L'inhibition chronique de l'enzyme de dégradation de l'AEA : un modulateur de la sphère émotionnelle chez les rats abstinents. 112

IV.D.1. Effet de l'inhibition chronique de l'enzyme de dégradation de l'AEA sur la composante anxiété 112

IV.D.2. Effet de l'inhibition chronique de l'enzyme de dégradation de l'AEA sur la composante dépression 113

IV.D.3. Effet de l'inhibition chronique de l'enzyme de dégradation de l'AEA sur la réactivité de l'axe HPA 113

IV.D.4. Conclusion 114

DISCUSSION GÉNÉRALE 115

I. Rappel des principaux résultats 116

II. ROLE DES ELEMENTS DU SEC 117

II.A. Le SEC dans l'addiction à la nicotine 117

II.A.1. Le SEC : un site de modulation des propriétés renforçantes de la nicotine 117

II.A.2. Le SEC : un modulateur à long terme des propriétés incitatives de la nicotine 118

II.B. Effet de l'inhibition chronique de l'enzyme de dégradation de l'AEA sur les composantes anxieuse et dépressive des rats abstinents de la nicotine 119

II.C. Effet du traitement chronique à l'URB597 sur la fonctionnalité des récepteurs CB1 120

III. ROLE DES ELEMENTS QUI N'APPARTIENNENT PAS AU SEC 122

III.A. Les récepteurs TRPV1 122
III.B. Les récepteurs PPAR-α 124

IV. Perspectives 126

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 128

INDEX DES FIGURES

Figure 1. Activation des récepteurs cannabinoïdes par un agoniste cannabinoïde.

Figure 2. Structure chimique de l'anandamide (AEA).

Figure 3. Structure chimique du 2- arachidonyl glycerol (2-AG).

Figure 4. Enzymes de synthèse et de dégradation des eCB.

Figure 5. Structure chimique de la noladine éther.

Figure 6. Structure chimique de la virodhamine.

Figure 7. Structure chimique de la N-arachidonyl-dopamine (NADA).

Figure 8. Représentation schématique du système de récompense.

Figure 9. Représentation schématique de la structure du récepteur à l'acétylcholine.

Figure 10. Localisation des ARNm et des protéines de différentes sous-unités des récepteurs nACh dans les régions importantes pour l'expression des effets renforçants de la nicotine.

Figure 11. Dispositif expérimental utilisé pour l'auto-administration intraveineuse de nicotine.

Figure 12. Sites d'injections intracérébrales d'AM251

Figure 13. Dispositif pour le test du labyrinthe en croix surélevé.

Figure 14. Test d'hypophagie induite par la nouveauté.

Figure 15. Dispositif pour le test de la nage forcée.

Figure 16. Cage d'activité.

Figure 17. Tapis roulant électrifié pour le test de résistance à l'effort.

Figure 18. Protocole expérimental.

Figure 19. Effet de l'injection périphérique de l'AM251 sur la prise volontaire de nicotine.

Figure 20. Effet de l'injection intra-ATV de l'AM251 sur l'auto-administration de nicotine.

Figure 21. Effet de l'injection intra-Nac de l'AM251 sur l'auto-administration de nicotine.

Figure 22. Effet de l'injection intra-BNST de l'AM251 sur l'auto-administration de nicotine.

Figure 23. Effet de l'injection d'AM251 intra-ATV sur un comportement opérant pour un renforçateur hydrique.

Figure 24. Effet de l'injection intra-ATV d'AM251 sur l'activité locomotrice.

Figure 25. Histoire pharmacologique des rats exposés à l'AAIV de nicotine.

Figure 26. Histoire pharmacologique des rats traités par injections répétées de nicotine.

Figure 27. Représentation d'une semaine de comportement d'auto-administration intraveineuse à FR5 en fin d'exposition.

Figure 28. Consommation totale de nicotine (60µg nicotine base/kg/0.1ml).

Figure 29. Effet de l'inhibition chronique de l'enzyme de dégradation de l'AEA sur les propriétés incitatives de la nicotine chez les rats abstinents.

Figure 30. Effet de l'inhibition chronique de l'enzyme de dégradation de l'AEA sur les propriétés incitatives du stimulus précédemment associé à la prise de nicotine chez les rats abstinents.

Figure 31. Effet de l'inhibition chronique de l'enzyme de dégradation de l'AEA sur l'état d'anxiété des rats abstinents dans le test du labyrinthe en croix surélevé.

Figure 32. Effet de l'inhibition chronique de l'enzyme de dégradation de l'AEA sur l'état d'anxiété des rats abstinents dans le test d'hypophagie induite par la nouveauté.

Figure 33. Etude de corrélation entre deux tests permettant d'évaluer l'état d'anxiété des rats abstinents.

Figure 34. Effet de l'inhibition chronique de l'enzyme de dégradation de l'AEA sur l'état d'anxiété des rats abstinents dans le test d'interaction sociale.

Figure 35. Effet du blocage des récepteurs CB1 sur l'effet pro-anxieux du traitement à l'URB597 chez les rats abstinents dans le test du labyrinthe en croix surélevé.

Figure 36. Effet de l'inhibition chronique de l'enzyme de dégradation de l'AEA chez des rats abstinents dans le test de la nage forcée.

Figure 37. Effet du sevrage de la nicotine sur l'anhédonie

Figure 38. Effet de l'exposition à la nicotine et de l'inhibition chronique de l'enzyme de dégradation de l'AEA sur l'anhédonie

Figure 39. Effet du sevrage nicotinique sur l'activité locomotrice

Figure 40. Effet de l'inhibition chronique de l'enzyme de dégradation de l'AEA sur la résistance à l'effort.

Figure 41. Cinétique de la réponse de l'axe corticotrope en réponse à un stress de contention chez a) les animaux naïfs et b) chez les animaux abstinents.

Figure 42. Taux de corticostérone plasmatique à T120

ABREVIATIONS

AAIV : auto-administration intra-veineuse

AEA : anandamide

2-AG : 2 arachidonylglycerol

AM : amygdale

ATV : aire tégmentale ventrale

BLA : noyau basolatéral de l'amygdale

BNST : noyau du lit de la strie terminale

CB1 : récepteur cannabinoïde de type 1

CB2: récepteur cannabinoïde de type 2

CEA : noyau central de l'amygdale

CPP : conditionnement de préférence de place

CPF : cortex préfrontal

DA : dopamine

DAG: 1,2 diacylglycol

eCB : endocannabinoïde

FAAH : Fatty acid amide hydrolase

GABA : acide γ-aminobutyrique

Glu : glutamate

GPCR : récepteur couplé à une proteine G

HPA: hypothalamic-pituitary-adrena axis ou axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien

5-HT: sérotonine

MGL : monoacylglycéride lipase

NA : noradrénaline

Nac : noyau accumbens

NADA : N-arachidonoyldopamine

NAPE : arachidonyl-phosphatidyléthanolamine

NMDA : n-méthyl-D-aspartate

OEA : oleoylethanolamine

PEA : pamitoylethanolamide

PKA : protéine kinase A

PLD : phospholipase D

PPAR-α : peroxisome proliferator activated receptor alpha

SEC : système endocannabinoïde

SNC : système nerveux central

STRATU : studies with Rimonabant and tobacco use

Δ9-THC : Δ9-tétrahydrocannabinol

TRPV1 : transient receptor potential vanilloid receptor type 1

INTRODUCTION

I. Le système endocannabinoïde

I.A. Historique

Depuis l'antiquité, le cannabis ou chanvre est utilisé comme source de fibres pour la fabrication de cordages et de tissus. Ses propriétés médicinales sont évoquées pour la première fois dans un ouvrage pharmaceutique chinois datant de 2737 avant JC. Les usages thérapeutiques, récréatifs et rituels du cannabis se sont ensuite répandus vers l'Inde, le Moyen-Orient, l'Egypte, la Grèce et l'Occident au 19 ème siècle. Mais la découverte du système cannabinoïde endogène ou système endocannabinoïde (SEC) débute vraiment en 1964 avec la purification du principe actif du cannabis : Δ9-tétrahydrocannabinol (Δ9-THC) par Raphaël Mechoulam et ses collaborateurs (Gaoni et al, 1964). La chimie des cannabinoïdes (CB) connut alors un véritable essor, paradoxalement leurs mécanismes d'actions moléculaires demeuraient flous. En 1990 seulement, le premier récepteur des cannabinoïdes, le récepteur cannabinoïde de type 1 (CB1) fut cloné dans le système nerveux central (Matsuda et al., 1990). Ultérieurement un autre récepteur fut identifié dans le système immunitaire et dans la rate puis dans les neurones et la microglie, le récepteur cannabinoïde de type 2 (CB2) (Munro et al., 1993; Schatz et al., 1997; Brown et al., 2002). En absence de ligand endogène, les récepteurs CB1 et CB2 furent initialement apparentés aux récepteurs orphelins. Mais en 1992, à partir d'un cerveau de porc, Devane et ses collaborateurs réussirent à isoler un lipide arachidonoyléthanolamide aussi appelé anandamide (AEA), fusion des mots « *ananda* » (bonheur suprême en sanskrit) et amide (du fait de sa structure chimique). Ce lipide fixe les récepteurs cannabinoïdes CB1 avec une forte affinité et mime les effets comportementaux du THC quand il est injecté chez le rat. Trois ans après, un second endocannabinoïde (eCB), le 2-arachidonylglycerol (2-AG) fut découvert de façon indépendante et simultanée par deux équipes (Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1995). D'autres molécules furent par la suite identifiées, augmentant ainsi le nombre d'outils spécifiques pour étudier le SEC. Aujourd'hui, on regroupe sous le nom de SEC : les récepteurs aux cannabinoïdes, leurs ligands endogènes et les enzymes impliquées dans la synthèse et la dégradation des eCB. Les études moléculaires, biochimiques, cellulaires et physiologiques ont permis de démontrer l'implication du SEC dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques.

I.B. Les récepteurs aux cannabinoïdes

Les effets physiologiques des cannabinoïdes sont principalement relayés par deux récepteurs CB1 et CB2, appartenant à la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à des protéines G. Le récepteur CB1 est couplé aux protéines Gi et Go de façon indifférenciée mais également aux protéines Gq et Gs, alors que le récepteur CB2 est préférentiellement couplé aux protéines Go. La plupart des effets des eCB sont attribués à leur action sur les récepteurs CB1 et/ou CB2. Depuis peu, un nouveau type de récepteur cannabinoïde est en cours de caractérisation : le GRP55 (Begg et al., 2005; Mackie and Stella, 2006; Ryberg et al., 2007). Dans ce paragraphe nous nous focaliserons sur la présentation des récepteurs CB1 et CB2.

I.B.1. Le récepteur CB1

Cloné pour la première fois en 1990, le récepteur CB1 est composé de 472 acides aminés chez l'homme (Matsuda et al., 1990). Sa séquence protéique est très conservée chez les vertébrés, ainsi le récepteur humain possède une homologie de séquence de 97.3% avec le rat et de 97% avec la souris (Lutz, 2002). Il appartient à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RPCG). Il comprend une extrémité N-terminale extracellulaire ponctuée de divers sites de glycosylation, une extrémité C-terminale intracellulaire et sept hélices α transmembranaires reliées entre elles par des boucles intra- et extracellulaires.

I.B.1.a Localisation

On trouve les récepteurs CB1 principalement dans le système neveux centrale (SNC) mais également dans des tissus périphériques. Dans le SNC, ils sont exprimés par les neurones et les astrocytes (Herkenham et al., 1990; Matsuda et al., 1990; Navarrete and Araque, 2008). Les récepteurs CB1 sont synthétisés dans les corps cellulaires des neurones puis transportés dans leurs terminaisons axonales. Ils sont présents au niveau pré-synaptique à un fort niveau sur les interneurones GABA et à un plus faible niveau dans terminaisons Glutamatergiques (Marsicano and Lutz, 1999; Katona et al., 2006; Uchigashima et al., 2007; Mackie, 2008). Dans les deux cas, la stimulation des récepteurs CB1 produit une inhibition de la libération du neurotransmetteur. On les trouve à des concentrations variables selon les structures : un nombre élevé de récepteurs CB1 se trouve dans l'hippocampe, le noyau caudé, le cervelet (mémoire et coordination motrice), le cortex cérébral (fonctions cérébrales supérieures) et

dans le noyau accumbens et l'aire tegmentale ventrale (centre du plaisir). On les trouve à des concentrations moyennement élevées dans la substance grise péri-épendymaire du mésencéphale, le bulbe ventrolatéral rostral, les couches superficielles des cornes supérieures de la moelle, le ganglion spinal et les nerfs sensitifs périphériques (transmission et la modulation de la douleur à partir du cerveau jusqu'aux nerfs sensitifs). En outre, on trouve des récepteurs CB1 dans des régions qui contrôlent : la régulation thermique, les fonctions endocriniennes et reproductrices (hypothalamus et hypophyse), les réponses émotionnelles et la peur (l'amygdale, l'hippocampe, le cortex préfrontal et l'hypothalamus), les nausées et les vomissements (noyau du faisceau solitaire) (Herkenham et al., 1991; Pertwee, 1997; Hohmann and Herkenham, 1998, 1999; Sanudo-Pena et al., 1999; Robbe et al., 2002; Mackie, 2005).

I.B.2. Le récepteur CB2

Cloné trois ans après le récepteur CB1, le récepteur cannabinoïde de type 2 (CB2) est composé de 360 acides aminés chez l'homme. La comparaison des séquences peptidiques du récepteur CB2 avec celles du récepteur CB1 révèle un pourcentage d'homologie totale de 44% (Howlett et al., 2002). Malgré ce faible pourcentage d'homologie, les caractéristiques pharmacologiques des deux récepteurs sont assez proches et la plupart des ligands qui interagissent avec les récepteurs CB1, interagissent aussi avec les récepteurs CB2 (Di Marzo et al., 2004). Le récepteur CB2 n'a pour l'instant été cloné que chez les mammifères : l'homme, le rat et la souris. Ces récepteurs sont principalement localisés dans le système immunitaire (Klein et al., 2001) et sont présents en forte densité dans la rate. Toutefois leur présence a été mise en évidence dans le SNC : dans les cellules de la microglie (Ashton et al., 2006) et dans les neurones (Skaper et al., 1996; Gong et al., 2006; Katona et al., 2006; Mackie, 2008; Morgan et al., 2009). Une des fonctions attribuée aux récepteurs CB2 du système immunitaire est de contrôler la libération de cytokines responsables de la réaction inflammatoire et de la régulation du système immunitaire. Les récepteurs CB2 sont également impliqués dans les effets des drogues d'abus comme la cocaïne et dans la dépression (Onaivi et al., 2008; Xi et al., 2011)

I.B.3. Voie de transduction associée aux récepteurs CB1 et CB2

Les récepteurs CB1 et CB2 présentent des similitudes au niveau de leur voie de transduction. En effet, l'activation des récepteurs CB1 et CB2 provoque la stimulation des

protéines hétérotrimèriques Gi/o entrainant l'inhibition de l'adenylate cyclase (AC) et l'inactivation de la voie de phosphorylation de la protéine kinase A (PKA) ou la stimulation de la protéine kinase activée par une substance mitogène (MAPK). Ces évènements intracellulaires conduisent à la régulation de l'expression de différents gènes. Cependant, les récepteurs CB1 déclenchent également une cascade complexe de protéines de phosphorylation, impliquant notamment la phosphoinositide-3-kinase et la protéine kinase B. La stimulation des protéines Gi/o par les récepteurs CB1 seulement (Felder et al., 1995), est associée à l'inhibition des canaux calcium (Ca2+) de type N et P/Q voltages dépendants et à la stimulation des canaux potassium (K+) à rectification entrante ; ce qui diminue l'excitabilité neuronale et provoque l'inhibition de la libération du neurotransmetteur (Wilson and Nicoll, 2002). L'activation de l'une ou l'autre de ces deux voies par les récepteurs cannabinoïdes dépend de l'agoniste étudié.

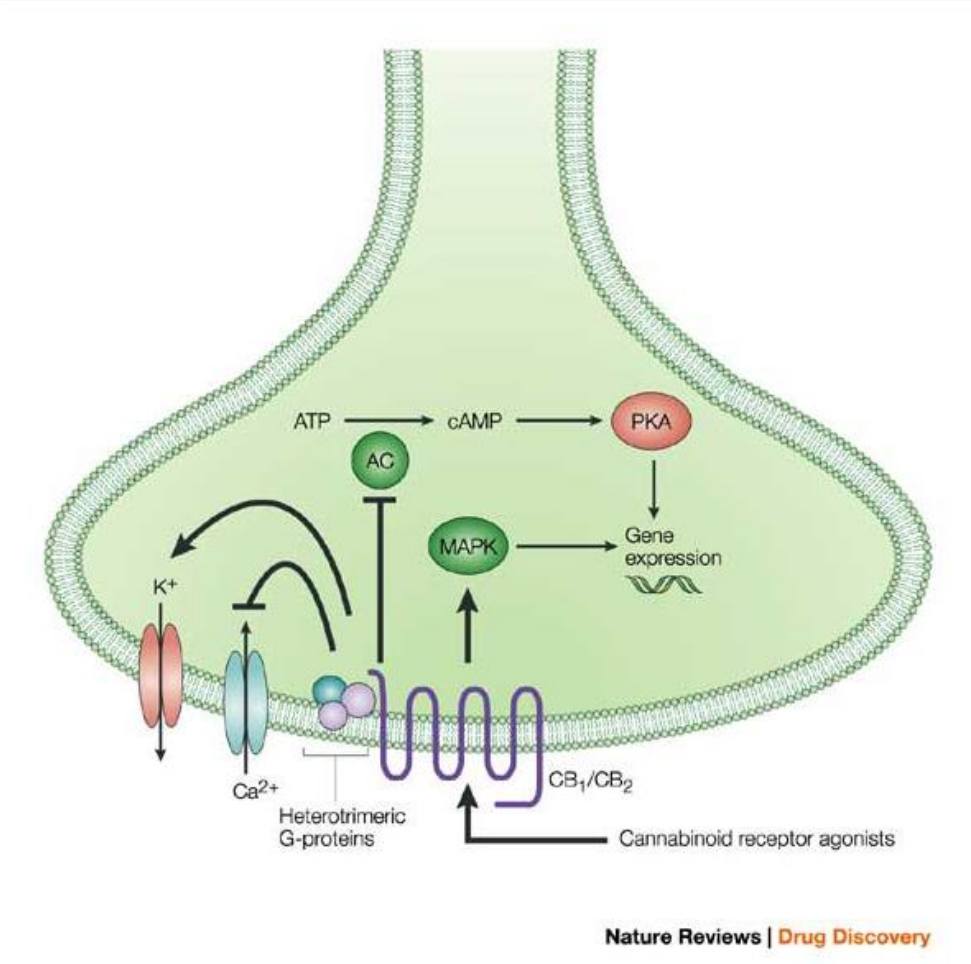


Figure 1 : Activation des récepteurs cannabinoïdes par un agoniste cannabinoïde :
ATP : adenosine triphosphate, AMPc : adenosine monophosphate cyclique.
D'après Di Marzo, 2004.

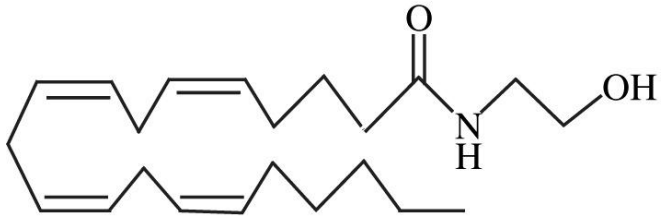
I.C. Les cannabinoïdes endogènes ou endocannabinoïdes.

Les endocannabinoïdes (eCB) sont des molécules endogènes capables de se lier à un récepteur cannabinoïde et d'activer les voies de transduction du signal auxquelles est couplé le récepteur. Ce sont des neuromédiateurs lipidiques comprenant des amides, des esters et des éthers d'acides gras à chaîne polyinsaturée. Ils possèdent les caractéristiques des neurotransmetteurs classiques desquels ils se distinguent toutefois par leur mode de libération et de stockage. En effet, les eCB sont produits « à la demande », après dépolarisation cellulaire ou stimulation de récepteurs de manière calcium-dépendant qui conduisent à l'hydrolyse de précurseurs lipidiques membranaires (Di Marzo et al., 1994; Gomez-Ruiz et al., 2007). Ils ne sont pas stockés dans les vésicules synaptiques mais sont libérés par le neurone après leur production et agissent comme « messagers rétrogrades » en se liant aux récepteurs localisés sur les terminaisons présynaptiques (Piomelli, 2003). Les eCB sont également caractérisés par leur capacité à induire une tétrade comportementale constituée : d'une analgésie, d'une hypothermie, de la catalepsie et d'une hypolocomotion. A l'heure actuelle de nombreux agonistes endogènes ont été identifiés : l'anandamide (Devane et al., 1992), le 2 archydonyl glycerol (Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1995), le palmitoyléthanolamide , l'oleoylethanolamide, le Noladin éther (Hanus et al., 2001), la Virodhamine (Porter et al., 2002) et la N-arachidonyledopamine (Bisogno et al., 2000; Huang et al., 2002). Dans ce paragraphe je présenterai de façon détaillée les deux principaux eCB : l'AEA et le 2-AG.

I.C.1. L'anandamide

L'anandamide (AEA) est constitué d'une molécule d'acide arachidonique liée à une molécule d'éthanolamine par une liaison amide (Figure 2). L'AEA peut être un agoniste total ou partiel des récepteurs CB1 (constantes d'inhibition Ki = 72 nM) en fonction du tissu et de la réponse biologique mesurée. Cependant, il se fixe également aux récepteurs CB2 avec une très faible affinité (Ki=279 nM) (Gonsiorek et al., 2000) et peut aussi fixer des récepteurs non-cannabinoïdes comme les récepteurs TRPV1 (Transient receptor potential vanilloïde 1) avec une faible affinité (Zygmunt et al., 1999; Vriens et al., 2009). Les TRPV1 sont des récepteurs canaux ionotropiques dont le ligand spécifique est la capsaïne. La fixation de l'AEA sur les TRPV1 entraine une élévation des niveaux de calcium et la potentialisation de la transmission synaptique glutamatergique (Starowicz et al., 2007b; Kawahara et al.). Le cannabinoïde : pamitoylethanolamide (PEA) diminue de moitié la valeur du Ki de fixation de

l'AEA sur les récepteurs TRPV1(De Petrocellis et al., 2001). L'AEA est également capable d'activer des récepteurs nucléaire modulateurs de la transcription génétique tel que lePPAR-α : recepteur activé par les proliferateurs du peroxisome de type α (O'Sullivan, 2007). Les concentrations de l'AEA dans le cerveau sont comparables à celles d'autres neurotransmetteurs comme la dopamine et la sérotonine. On trouve les concentrations les plus élevées dans les structures où l'expression du récepteur CB1 est la plus importante, c'est-à-dire dans l'hippocampe, le striatum, le cervelet et le cortex (Di Marzo et al., 1994).

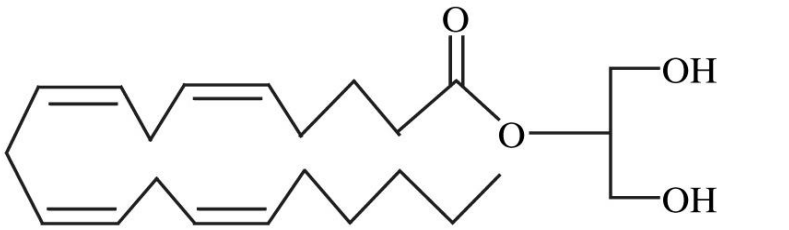


Anandamide

Figure 2 : **Structure chimique de l'anandamide (AEA).**
D'après De Petrocellis, 2010.

I.C.2. Le 2 arachidonyl-glycerol

Le 2-arachidonyl-glycerol ou 2-AG est un ester (Figure 3) formé à partir de l'acide gras oméga-6. La synthèse du 2-AG s'effectue à partir de phospholipides membranaires qui après action de la phospholipase C (PLC) sont transformés en composés intermédiaires comme, le 1,2 diacylglycerol (DAG). Le DAG hydrolysé par la DAG lipase libère le 2-AG (Farooqui et al., 1989). Le 2-AG est un ligand naturel à la fois des récepteurs CB1 et CB2 (Sugiura and Waku, 2000). Il est présent dans le cerveau avec une plus forte concentration que l'AEA. De plus, le 2-AG est un agoniste total des récepteurs CB1 (Ki = 58 nM) et des récepteurs CB2 (Ki = 145 nM) (Childers and Breivogel, 1998; Sugiura et al., 2006). L'activité biologique du 2-AG est décrite dans la fonction immunitaire, la prolifération cellulaire, le développement embryonnaire, la potentialisation à long terme dans l'hippocampe, la neuroprotection et neuromodulation ainsi que dans la fonction cardiovasculaire et dans la réponse inflammatoire.



2-Arachidonoylglycerol

Figure 3 : Structure chimique du 2- arachidonyl glycerol (2-AG).
D'après De Petrocellis, 2010

I.C.3. Métabolisme des endocannabinoïdes

Les eCB sont synthétisés « à la demande » dans les neurones et les astrocytes après stimulation de différents récepteurs conduisant à l'hydrolyse de précurseurs lipidiques membranaires (pour revue voir (Muccioli, 2010). De par leur nature lipidique, ils ne sont pas stockés dans des vésicules synaptiques et diffusent librement après leur production. Ce sont des neurotransmetteurs atypiques puisqu'ils sont libérés par les neurones post-synaptiques pour ensuite agir sur les terminaisons pré-synaptiques où sont localisés les récepteurs fonctionnels.

Contrairement aux neurotransmetteurs « classiques » qui sont dégradés dans la fente synaptique, l'arrêt de la signalisation eCB résulte du transport des eCB dans les neurones, où ils sont hydrolysés. Les eCB sont recaptés de deux façons : soit par diffusion passive, soit par transport actif via un transporteur membranaire. Dans les neurones, les eCB sont dégradés par des enzymes appartenant à la famille des sérine-hydrosylases.

L'**AEA** est synthétisé dans le neurone post-synaptique à partir du clivage de l'arachidonyl-phosphatidyléthanolamine (NAPE), un lipide complexe de la membrane cellulaire, par l'action d'une enzyme spécifique : la phospholipase D (PLD) qui est activée par une dépolarisation ou par la stimulation d'un récepteur couplé à une protéine G (GPCR). La synthèse du NAPE est catalysée par l'enzyme membranaire N-acetyltransferase (NAT). Cette enzyme est activée par le Ca2+ et l'AMP cyclique (Cadas et al., 1997). L'AEA agit de façon rétrograde sur les récepteurs CB1 pré-synaptiques. Il régule la libération de neurotransmetteurs grâce à un second système de transduction (augmentation du Ca2+ intracellulaire via les canaux calcique voltage dépendants ou le récepteur NMDA (n-méthyl-D-aspartate). L'AEA agit également comme un neuromodulateur pour la plupart des systèmes de transmission au niveau post-synaptique où il régule l'excitabilité et la plasticité synaptique

par la modulation de canaux potassium (K+) et la régulation de protéines kinases (PKA et MAPK).

Dans le SNC, l'anandamide est éliminé par un processus de désactivation à deux étapes. D'abord, le ligand endogène traverse la membrane pour entrer dans le neurone post-synaptique par un système de transporteur. Ensuite, une fois que l'anandamide est internalisé, il est hydrolysé en acide arachidonique et éthanolamine par l'enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH) (Cravatt et al., 1996), une sérine hydrolase qui est localisée dans les membranes intracellulaires du réticulum endoplasmique et de l'appareil de golgi (Egertova et al., 2003; Clapper et al., 2009).

Pour le 2-AG, deux voies de synthèse ont été identifiées. La première fait intervenir le clivage d'un phosphatidylinositol en 1,2-diacylglycerol (DAG) par la phospholipase C (PLC). Le DAG hydrolysé par la DAG lipase libère ensuite la molécule de 2-AG (Stella et al., 1997; Piomelli, 2003). La seconde voie implique le clivage du phosphatidylinositol par la PLA1 et induit la production du 2-arachidonoyl-lysophospholipide, ensuite hydrolysé par la lyso-PLC, libérant alors la molécule de 2-AG (Higgs and Glomset, 1994). Bien que la formation de 2-AG dépende également du Ca2+, sa régulation est indépendante de la synthèse et de la libération d'AEA.

La dégradation du 2-AG est catalysée par la monoacylglyceride lipase (MGL), présente dans les terminaisons pré-synaptiques portant les récepteurs CB1. Elle transforme le 2-AG en glycérol et acide arachidonique (Dinh et al., 2002).

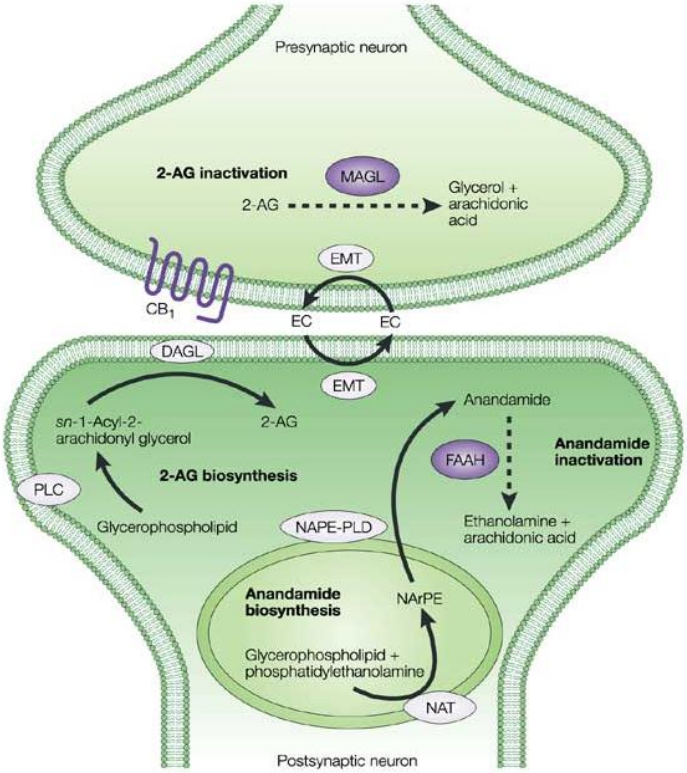


Figure 4 : Enzymes de synthèse et de dégradation des eCB.

Les enzymes d'hydrolyse sont impliquées à la fois dans la biosynthèse et la dégradation des eCB. Les enzymes de synthèse de l'AEA : la N-acyltransferase (NAT) et N-acylphosphatidyl-ethanolamine phospholipase D (NAPE-PLD) et l'enzyme de dégradation de l'AEA : la fatty acide amide hydrolase (FAAH) sont localisées au niveau post-synaptique dans la membrane intracellulaire ou réticulaire. Les transporteurs membranaires des eCB facilitent la libération et la recapture des eCB et sont localisés à la fois dans les neurones pré- et post-synaptiques. Les enzymes de synthèse du 2-AG ; la phospholipase C (PLC) et sn-1-selecive diacylglycerol lipase (DAGL) sont localisées dans la membrane plasmique post-synaptique. L'enzyme de dégradation du 2-AG , la monoacylglycerol lipase (MAGL) est localisée dans le neurone pré-synaptique. *(D'aprés Di Marzo, 2004).*

I.C.4. Autres molécules appartenant à la famille des endocannabinoïdes

I.C.4.a Palmotoylethanolamide (PEA) et Oleoylethanolamide (OEA)

Le palmitoylethanolamide et l'oleoylethanolamide sont des acylethanolamides analogues de l'AEA (Hansen, 2010). Contrairement ausx eCB classiques, ils possèdent une affinité négligeable pour les récepteurs CB1 et CB2 (Lambert and Di Marzo, 1999). Le PEA et le

OEA activent différents récepteurs, tels que les PPAR-α (Fu et al., 2003), les récepteurs TRPV1(Ahern, 2003) et inhibent les canaux potassium.. L'OEA possé également la capacité d'activer le récepteur Orphan GPR119(Overton et al., 2006).

Les concentrations de PEA et OEA sont augmentés par l'inhibition de la FAAH (Tsuboi et al., 2007). Via l'activation des récepteurs PPAR-α, le PEA possède des propriétés anti-nociceptives et anti inflammatoire (Calignano et al., 2001; Lo Verme et al., 2005) et le OEA est impliqué dans le phénoméne de sasiété (Rodriguez de Fonseca et al., 2001; Gaetani et al., 2003).

I.C.4.b Noladine éther (2-arachidonoyl glyceryl ether)

La noladine éther (Figure 5) a été isolé en 2001 à partir de cerveau de porc (Hanus et al., 2001). C'est un agoniste des récepteurs CB1 et CB2, avec une affinité plus importante pour les récepteurs CB1 (R-CB1 Ki = 9.1 nM et R-CB2 Ki = 480 nM) (Hanus et al., 2001). Les plus fortes concentrations de cet eCB se trouvent dans le thalamus et l'hippocampe (Fezza et al., 2002). Elle provoque tous les effets spécifiques de la tétrade cannabinoïde : sédation, hypothermie et une légère anti nociception chez la souris (Sugiura et al., 1999; Hanus et al., 2001).

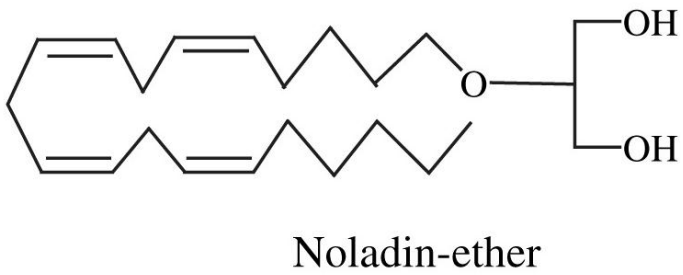
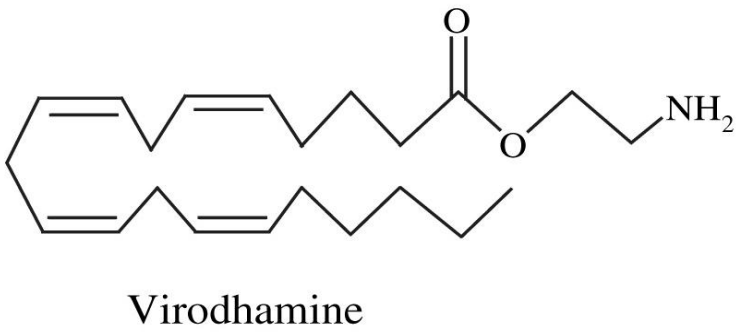


Figure 5 : Structure chimique de la noladine éther.
*(D'après De Petrocellis, 2010)***.**

I.C.4.c Virodhamine (O-arachidonoyl ethanolamine)

La virodhamine (Figure 6) est constituée d'une molécule d'acide arachidonique liée par une liaison ester à une molécule d'éthanolamine. Elle est produite dans l'hippocampe, le cortex et le cervelet de rat en concentration similaire à l'AEA. Elle a également été mise en évidence dans les tissus périphériques à des concentrations 2 à 9 fois supérieures à celles de l'AEA. C'est un agoniste partiel des récepteurs CB1, ce qui lui confère une activité

antagoniste *in vivo*. En revanche, elle agit comme un agoniste total sur les récepteurs CB2. Les mécanismes de sa synthèse ne sont pas encore bien caractérisés et la virodhamine pourrait être dégradée par les mêmes voies que l'AEA (Porter et al., 2002). Chez la souris, l'administration de Virodhamine diminue la temprérature corporelle (Porter et al., 2002).

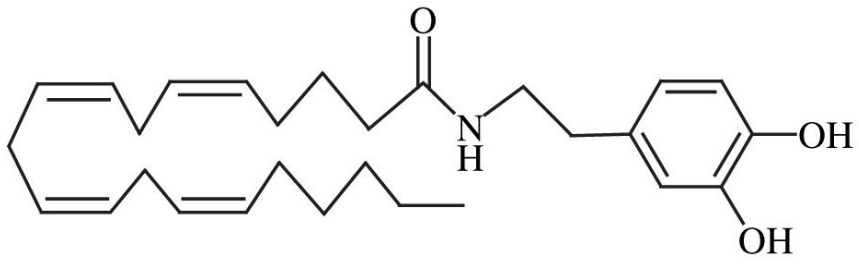


Virodhamine

Figure 6 : Structure chimique de la virodhamine.
(D'après De Petrocellis, 2010).

I.C.4.d N-arachidonyl-dopamine (NADA).

Le N-arachidonyl-dopamine ou NADA (Figure 7) est une substance endogène présente dans les tissus nerveux avec une forte concentration dans le striatum, l'hippocampe et le cerebellum (Chu et al., 2003). NADA active les récepteurs CB1 et provoque la plupart des effets de la tétrade cannabinoïde. Du fait de ses propriétés « capsaicin-like » , le NADA active également les récepteurs TRPV1 et provoque une hyperalgie lorsqu'il est administré de façon systémique (Huang et al., 2002).



N-arachidonoyldopamine

Figure 7 : Structure chimique de la N-arachidonyl-dopamine (NADA).
(D'après De Petrocellis, 2010).

I.D. Le système endocannabinoïde : un système au mode de fonctionnement biphasique, impliqué dans de nombreux comportements.

Les cannabinoïdes endogènes et exogènes qui agissent sur les récepteurs CB1 sont impliqués dans le contrôle d'une pléiade de fonctions comportementales et neuroendocriniennes, telles que le contrôle de la coordination motrice, la mémoire, la douleur, l'anxiété, la régulation de l'homéostasie énergétique et la régulation de la prise alimentaire. La stimulation des récepteurs CB1 entraine des réponses de type biphasique : les agonistes des récepteurs CB1 sont connus pour produire une réponse comportementale dans une gamme de doses données, puis produire la réponse opposée lorsque la dose de l'agoniste est trop élevée. Chez l'homme comme chez l'animal, on caractérise les molécules à activité cannabinoïde grâce à leur capacité à induire une tétrade comportementale appelée la « tétrade cannabinoïde ». Elle se caractérise en réponse à l'administration périphérique d'un cannabinoïde exogène ou endogène par l'apparition d'une analgésie, d'une hypothermie, d'une catalepsie et d'une hypolocomotion. Après une brève présentation de la « tétrade cannabinoïde », nous présenterons l'implication des cannabinoïdes dans la régulation de la mémoire et des émotions, éléments essentiels pour la compréhension des travaux présentés ultérieurement.

I.D.1. La tétrade cannabinoïde

Chez le rongeur, les agonistes cannabinoïdes produisent une tétrade comportementale (Martin et al., 1987) bloquée par l'administration d'un antagoniste des récepteurs CB1 confirmant le rôle essentiel des récepteurs CB1 dans la médiation des effets des molécules cannabinoïdes (Rinaldi-Carmona et al., 1994; Compton et al., 1996; Varvel et al., 2005). Curieusement chez la souris, tous ces effets ne sont pas bloqués par l'antagoniste des récepteurs CB1 seul (Adams et al., 1998). Cependant, les effets de la tétrade sont abolis chez les souris KO pour les récepteurs CB1 (Ledent et al., 1999; Zimmer et al., 1999).

La tétrade cannabinoïde a permis de suggérer l'implication des eCB dans :

i) la perception de la douleur. En effet, l'hyperalgésie observée après l'inhibition des récepteurs CB1 a permis de mettre en évidence l'existence d'un tonus eCB analgésique (Pertwee, 2001),

ii) l'activité locomotrice. Les eCB jouent un rôle inhibiteur dans le striatum sur le contrôle de la motricité qui s'oppose aux effets facilitateurs de la dopamine. Les eCB en stimulant les récepteurs CB1 du cervelet régulent la coordination (El Manira and Kyriakatos, 2010).

iii) la régulation de la température corporelle via les neurones glutamatergiques corticaux (Monory et al., 2007)

iv) la cataplexie (Monory et al., 2007)

Cependant les effets de la tétrade ne représentent pas la multitude de fonctions pharmacologiques dans lesquelles sont impliqués les cannabinoïdes.

I.D.2. Endocannabinoïdes et mémoire

Le niveau d'expression des récepteurs CB1 et les concentrations des eCB sont élevés dans l'hippocampe, structure clé de l'apprentissage et de la mémoire, (Herkenham et al., 1991; Di Marzo et al., 2000a). La capacité des eCB à moduler la plasticité synaptique et à inhiber la formation de nouvelles synapses, en fait un des acteurs clé de la mise en mémoire des informations à court et à long terme. Les eCB en activant les récepteurs CB1 peuvent induire la diminution à long terme de la libération de neurotransmetteurs. Ce phénomene est appelé dépolarisation à long terme induite par les eCB (LTD-eCB) (Heifets and Castillo, 2009). Son blocage empêche l'extinction du comportement dans un test de mémoire procédurale : le labyrinthe en T (Rueda-Orozco et al., 2008).

La plupart des études menées chez les animaux se sont intéressées au rôle du SEC dans la mémoire spatiale. Elles ont montré que l'administration d'agonistes CB1 (exogènes et endogènes) dégrade la mémoire de travail et l'acquisition d'une mémoire à long terme, alors que l'inactivation des récepteurs CB1 par blocage génétique ou pharmacologique avait parfois des effets pro-mnésiques (Reibaud et al., 1999). L'augmentation du tonus eCB permet également d'observer un effet pro-mnésique. Par exemple, l'inhibition de l'enzyme de dégradation de l'AEA accélére l'acquisition et l'extinction dans le test de mémoire spatiale du labyrinthe aquatique (Varvel et al., 2007).

I.D.3. Endocannabinoïdes et prise alimentaire

Les eCB sont d'importants stimulants de la prise alimentaire et de la lipogenèse. Au niveau périphérique, les eCB participent à l'inhibition du signal de satiété (Gomez et al., 2002; Burdyga et al., 2004), stimulent la lipogenèse dans le foie et le tissu adipeux blanc (Cota, 2008) et régulent le métabolisme du glucose dans le pancréas et les muscles squelettiques (Liu

et al., 2005; Matias et al., 2006) via les récepteurs CB1. Au niveau central, et plus particulièrement dans l'hypothalamus, l'AEA et le 2-AG stimulent la prise alimentaire, en activant l'expression de neuropeptides orexigènes (ghreline) et en inhibant l'expression des peptides anorexigènes (leptine) (Di Marzo et al., 2004; Di Marzo and Matias, 2005; Kirkham, 2005). Chez l'animal, des études ont montré que l'injection aigue d'agonistes des récepteurs CB1 dans le shell du noyau accumbens (Kirkham et al., 2002; Soria-Gomez et al., 2007) et dans le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (Anderson-Baker et al., 1979; Jamshidi and Taylor, 2001; Verty et al., 2005) augmente la consommation de nourriture. Comme dans la plupart des comportements modulés par les eCB, l'agoniste CB1 exerce un contrôle biphasique sur la prise alimentaire, avec un effet orexigène à faibles doses et anorexigène pour les fortes doses (Crawley et al., 1993). Ainsi les récepteurs CB1 localisés au niveau du striatum ventral sont associés à une action hypophagique via une inhibition de la transmission GABAergique (Bellocchio et al., 2010). Au contraire, les récepteurs CB1 modulant la transmission glutamatergique excitatrice sous-tendent l'effet orexigène bien connu des cannabinoïdes (Bellocchio et al., 2010). Par ailleurs, il a été montré que la privation alimentaire chez les rats augmente les niveaux extracellulaires d'eCB, non seulement dans les structures qui contrôlent l'appétit comme l'hypothalamus, mais également dans les noyaux hypothalamiques et le Nac qui contrôlent la motivation (Kirkham et al., 2002). des récepteurs CB1 dans le shell du noyau accumbens (Kirkham et al., 2002; Soria-Gomez et al., 2007) et dans certains noyaux de l'hypothalamus (Anderson-Baker et al., 1979; Jamshidi and Taylor, 2001; Verty et al., 2005) permettait d'augmenter la consommation de nourriture. Comme dans la plus part des comportements modulés par les eCB, l'administration d'agoniste CB1 a un effet biphasique sur la prise alimentaire: avec un effet hyperphagique à faible dose et anorexigène pour des doses très élevée (Crawley et al., 1993). L'administration d'agonistes des récepteurs aux cannabinoïdes est aujourd'hui prescrite chez l'homme pour faciliter la prise alimentaire des personnes atteintes du cancer ou du VIH (Pagotto et al., 2006). En 2006, l'antagoniste des récepteurs CB1 (Rimonabant) fut proposé pour le traitement de l'obésité et l'hyperlipidémie. Bien que très efficace en temps qu'inhibiteur de la prise alimentaire et régulateur de l'homéostasie énergétique, il fut retiré du marché en 2008 suite à l'apparition de d'effets psychiatriques délétères.

I.D.4. Endocannabinoïdes et emotions

Les récepteurs CB1 localisés dans les structures limbiques participent à la régulation des réponses émotionnelles et les eCB semblent être indispensables au contrôle physiologique de l'état émotionnel.

I.D.4.a Endocannabinoïdes et anxiété

Chez l'Homme, le cannabis est principalement consommé pour l'effet relaxant qu'il procure. Paradoxalement, la consommation de très fortes quantités de cannabis ou son sevrage peuvent également provoquer une augmentation de l'anxiété et l'apparition de crises d'angoisses (Reilly et al., 1998). La découverte de l'implication des récepteurs CB1 dans ces effets du cannabis (Huestis et al., 2001) a permis de suggérer le rôle de la neurotransmission eCB dans la régulation de l'anxiété. Par la suite, de nombreuses études ont confirmé l'implication des eCB via l'activation des récepteurs CB1, dans le contrôle des comportements anxieux (Hill and Gorzalka, 2009). Dans le protocole de peur conditionnée, le blocage génétique ou pharmacologique des récepteurs CB1 empêche l'extinction du comportement de peur (Marsicano et al., 2002). Les eCB via l'activation des récepteurs CB1 jouent donc un rôle majeur dans la capacité d'adaptation comportementale des animaux face à un événement stressant. Des souris mutées pour le gène du récepteur CB1 présentent un comportement anxieux basal plus prononcé que les souris sauvages dans les modèles suivants : i) la boîte "claire/obscure" (Martin et al., 2002; Uriguen et al., 2004), ii) le labyrinthe en croix surélevé (Haller et al., 2002; Uriguen et al., 2004) et iii) les interactions sociales (Uriguen et al., 2004). Par ailleurs, les antagonistes des récepteurs CB1, SR141716A et son analogue structurel l'AM251, induisent également des effets anxiogènes dans le test de labyrinthe en croix surélevé chez les rongeurs (Navarro et al., 1997; Arevalo et al., 2001; Haller et al., 2004a; Patel and Hillard, 2006) et augmentent l'expression du marqueur neuronal d'activité : c-Fos, dans les régions impliquées dans la génération de la peur et de l'anxiété, telles que le CEA, le BNST, l'hypothalamus et le tronc cérébral (Rodriguez de Fonseca et al., 1997; Alonso et al., 1999; Patel et al., 2005a). Ces études suggèrent l'hypothèse selon laquelle le SEC est un système anxiolytique endogène qui diminue l'activité neuronale dans les régions du cerveau essentielles pour l'expression des réponses de peur et d'anxiété, alors qu'au contraire le blocage des récepteurs CB1 en situation stressante potentialise l'émergence d'un état anxieux. De façon surprenante, il a également été montré que les souris ko CB1 pouvaient exprimer un niveau basal d'anxiété comparable à celui de souris sauvages dans le test du labyrinthe en croix surélevé (Marsicano et al., 2002). Il semblerait que ces différences soient en fait la

conséquence de différences dans les conditions expérimentales choisies. En effet, il faut que le protocole de test et l'environnement soient suffisamment aversifs afin que les eCB soient libérés en quantité suffisante pour que les effets anxiolytiques s'expriment (Haller et al., 2002; Haller et al., 2004b).

L'occurrence d'un événement stressant entraine des modifications complexes des taux d'eCB qui diffèrent selon les espèces et les structures étudiées (Hill and McEwen, 2010). Chez le rat, le stress augmente le signal 2-AG et diminue les taux d'AEA (Hill et al., 2009), alors que chez la souris le stress augmente également les niveaux d'AEA sans modifier ceux du 2-AG (Patel et al., 2005b; Rademacher et al., 2008). Chez le rat, les stresseurs environnementaux, tels que la dérivation maternelle ou l'odeur de predateur, altèrent l'expression des enzymes de synthèse et de dégradation de la 2-AG, dans les régions responsables du contrôle des émotions (l'amygdale, l'hippocampe et le noyau gris periaqueducal) (Sutt et al., 2008; Suarez et al., 2010). Lors de l'exposition à un nouvel espace ouvert, les niveaux de 2-AG sont corrélés négativement avec l'hyper-locomotion provoquée par le stress (Eisenstein et al., 2010). L'inhibition pharmacologique par l'inhibiteur de MGL (JZL184), dans le test de labyrinthe en croix surélevée, provoque un effet anxiolytique dans un environnement aversif fortement éclairé (Sciolino et al., 2011). L'ensemble de ces données suggéré que le 2-AG régule, dans le cerveau, la réponse physiologique induite par un environnement aversif.

Il a été également proposé de cibler la transmission AEA pour diminuer l'état d'anxiété. L'inhibition pharmacologique par l'inhibiteur de FAAH (URB597) ou génétique de la FAAH (Kathuria et al., 2003) produit un effet anxiolytique dans les différents tests comportementaux de mesure de l'anxiété (Kathuria et al., 2003; Patel and Hillard, 2006; Naidu et al., 2007; Moreira et al., 2008). Cet effet anxiolytique est reversé par le blocage génétique ou pharmacologique des récepteurs CB1. Par ailleurs, l'action anxiolytique de l'URB597 ne s'accompagne pas des signes typiques d'intoxication aux cannabinoïdes tels que les éléments de la tétrade cannabinoïde. Ces données indiquent que l'AEA participe à la modulation de l'état émotionnel via les récepteurs CB1 et désignent les inhibiteurs pharmacologiques de la FAAH comme une approche thérapeutique innovante pour le traitement contre l'anxiété. Cependant, d'autres systèmes comme le système vanilloïde (Starowicz et al., 2007a) peuvent également interagirent avec le SEC pour moduler l'anxiété. En effet, les récepteurs TRPV1 sont responsables de certains effets de l'AEA. Des études immunologiques ont permis de mettre en évidence une co-expression des récepteurs CB1 et TRPV1 dans les structures impliquées dans la régulation des réponses émotionnelles (Cristino et al., 2006). L'inactivation génétique du récepteur TRPV1

diminue l'anxiété dans le labyrinthe en croix surélevé et la boîte "claire/obscure" ; et attenue la réponse de peur dans le test de peur conditionnée (Marsch et al., 2007). Par ailleurs, dans le cortex préfrontal, le blocage pharmacologique du récepteur TRPV1 réduit l'anxiété observée après une forte augmentation des taux d'AEA provoquée par l'administration d'URB597. A l'inverse, l'agoniste des récepteurs TRPV1 (la capsaïne) potentialise l'effet anxiogène des fortes concentrations d'AEA (Rubino et al., 2008a). Ces données suggèrent l'implication des récepteurs TRPV1 dans les effets anxiogènes liés à des niveaux importants d'AEA. Depuis, le rôle opposé des récepteurs CB1 et TRPV1 dans le contrôle de l'anxiété a été confirmé par de nombreuses études (Aguiar et al., 2009; Micale et al., 2009; Terzian et al., 2009).

I.D.4.b Endocannabinoïdes et dépression

Chez l'homme, l'état dépressif se caractérise par de nombreux symptômes : humeur dépressive, fatigue, augmentation de la sensibilité au stress, émotions négatives, déficits cognitifs, perte de poids, anhédonie et perturbation du sommeil. L'anhédonie et l'humeur dépressive sont les symptômes majeurs présents chez tous les patients : l'anhédonie se caractérisant par une incapacité à ressentir des émotions positives et du plaisir ; et l'humeur dépressive se caractérisant par un sentiment constant et général de tristesse et de désespoir. En revanche, chez l'animal, il n'existe pas de modèle de la dépression permettant d'examiner l'ensemble de la symptomatologie. Par ailleurs, certains symptômes de la dépression font appel à des processus dits supérieurs qui sont observés spécifiquement chez l'homme (Tanti and Belzung, 2010). L'étude de l'état dépressif chez animal consiste donc à examiner séparément les principaux symptômes comme l'état d'anhédonie évalué par la préférence pour une solution sucrée, l'état de résignation dans le test de la nage forcée (chez le rat et la souris) et de suspension caudale (chez la souris). La mesure de l'activité locomotrice permet de renseigner sur l'activité générale de l'animal.

Le rôle du SEC dans l'état dépressif a fait l'objet d'un nombre d'études grandissant depuis qu'il a été montré que le phénotype des animaux mutés pour les récepteurs CB1 rappelait fortement les symptômes de la dépression mélancolique (Hill and Gorzalka, 2005). Les études réalisées chez les souris KO CB1, ont montré que ces souris confrontées à un stress chronique deviennent anhédoniques plus rapidement que les souris sauvages (Martin et al., 2002). Les souris KO CB1 présentent également une altération de la motivation pour sortir d'une situation aversive que ce soit dans le test de la nage forcée (Steiner et al., 2008b) ou de suspension caudale (Aso et al., 2008). De plus, après exposition à un stress, les souris KO CB1 présentent des concentrations plasmatiques en corticostérone beaucoup plus élevées que

les sauvages. La forte augmentation des taux de corticostérone traduit une hyperactivité de l'axe HPA, qui est une des caractéristiques les plus communes de la dépression (Uriguen et al., 2004). L'ensemble de ces données suggère donc que le SEC, est une cible potentielle pour le traitement de la dépression. En accord avec ces données, des études menées chez les rongeurs, ont montré que l'augmentation des niveaux extracellulaires d'endocannabinoïdes aurait, d'une part, des effets de type antidépresseur, et d'autre part, augmenterait l'efficacité des antidépresseurs classiques (Gobbi et al., 2005; Hill and Gorzalka, 2005; Bortolato et al., 2007; Hill et al., 2008). De plus, l'exposition prolongée au THC durant l'adolescence diminue la fonctionnalité des récepteurs CB1 et conduit au développement d'un phénotype de type dépressif (Rubino et al., 2008b; Rubino et al., 2009). Ce phénotype dépressif est reversé par l'administration chronique d'un inhibiteur de l'enzyme de dégradation de l'AEA (URB597) à l'âge adulte (Realini et al., 2011). Ces données suggèrent donc l'hypothèse d'une hypofonction du signal CB1 dans l'apparition du phénotype dépressif et l'importance de l'augmentation de ce signal dans l'efficacité des effets antidépresseurs. De façon surprenante, plusieurs, études indiquent également un effet antidépresseur des antagonistes CB1 (Griebel et al., 2005; Witkin et al., 2005). A la vue de tels résultats divergents, il semble évident qu'il reste de nombreuses incertitudes sur le rôle exacte du SEC dans l'expression des symptômes dépressifs.

Modulation chronique du SEC

Il est important de noter que la majorité des études présentées ci-dessus ont principalement examiné l'effet aigu de la pharmacologie ciblant le SEC. Or il arrive parfois qu'on observe des effets complètement opposés lorsque l'on s'intéresse aux effets de l'usage chronique de ces traitements. Pour exemple, les études cliniques sur l'usage chronique du Rimonabant pour le traitement de l'obésité ont été stoppées suite à l'apparition chez certains sujets d'effets secondaires psychiatriques indésirables, tel que l'apparition d'un état dépressif et d'idées suicidaires (Nissen et al., 2008). Plus récemment, des travaux chez le rongeur ont également démontré un effet pro-dépresseur de l'usage chronique de l'antagoniste CB1 (Beyer et al., 2010).

L'ensemble des résultats mettent en évidence la limite des approches expérimentales actuelles ne considérant que l'effet d'une administration aigue de la molécule quand celle-ci est ultérieurement proposée pour un usage chronique. Il est donc absolument nécessaire de développer chez l'animal des approches qui prennent en compte l'étude longitudinale visant à

déterminer les effets majeurs positifs d'un traitement chronique, mais également les effets secondaires indésirables.

I.E. Contrôle des propriétés renforçantes des récompenses naturelles et pharmacologiques par le système endocannabinoïde.

Les récompenses naturelles (nourriture, sexe, jeu entre congénères, etc.) ou pharmacologiques activent le même circuit neuronal appelé « circuit de la récompense ». Brièvement, ce réseau est composé de l'ATV, du Nac, du CPF et du BLA (Wise, 2002). Les récompenses de type drogue ou non drogue ont toutes la particularité de provoquer la libération de dopamine au niveau du Nac et du striatum (Di Chiara and Imperato, 1988; Di Chiara and Bassareo, 2007). Le SEC participe au processus de récompense en facilitant la perception des effets positifs d'un renforçateur (Solinas et al., 2007; Fattore et al., 2010). Nous développerons ici le rôle du SEC dans le contrôle de la récompense alimentaire et dans le contrôles des propriétés renforçantes de 3 drogues d'abus : les opiacés, l'alcool et la cocaïne. Le contrôle des propriétés addictives de la nicotine sera développé dans la partie suivante (Cf paragraphe II.C.1).

I.E.1. Présentation du système de récompense

Le «circuit de récompense» est constitué d'un ensemble de voies neuronales impliquées dans la perception de la valeur appétitive des renforcements positifs, dans l'intégration de stimuli environnementaux prédictifs d'une récompense et dans leur traduction en réponses motrices adaptées à sa recherche. Les principaux centres du circuit de récompense sont localisés le long du faisceau médian du télencéphale, formé principalement des axones des neurones DA de l'ATV qui projettent vers le Nac. Ce circuit comprend plusieurs systèmes neuronaux dont le plus important semble être le système dopaminergique mésolimbique.

L'aire tegmentale ventrale (ATV) est constituée principalement de deux populations neuronales : i) les neurones DA qui projettent vers les structures limbiques telles que le Nac, l'AM et le CPF via la voie mésolimbique et mésocorticale, ii) les neurones inhibiteurs GABAergiques qui projettent sur le CPF, le Nac et le locus coeruleus et régulent l'activité des neurones DA grâce aux interneurones (Johnson and North, 1992; Omelchenko and Sesack, 2009). L'ATV est également constituée d'une troisième population neuronale moins abondante : les neurones glutamatergiques (Yamaguchi et al., 2007). Ces neurones innervent

plusieurs structures impliquées dans les processus émotionnels et cognitifs, en particulier le Nac et le CPF.

Le noyau accumbens (Nac) est localisé dans la partie ventrale du striatum. Il est principalement constitué de neurones GABA (Graveland and DiFiglia, 1985). Il reçoit de nombreuses afférences en provenance d'autres structures limbiques, dont le noyau basolatéral de l'amygdale (BLA), l'hippocampe et le CPF (Di Chiara, 2002). Certains neurones du Nac ciblent l'ATV permettant ainsi un rétrocontrôle par le Nac des influx qu'il reçoit de l'ATV. Le Nac peut être considéré comme une interface entre les processus qui sous-tendent la motivation et l'action car il reçoit les informations provenant des autres structures limbiques, les intègre et les transmet au système moteur *via* le pallidum ventral (Kalivas and Nakamura, 1999; Gardner, 2011).

Le noyau basolatéral de l'amygdale (BLA) est une structure essentielle dans l'attribution d'une valeur émotionnelle à un stimulus (pour revue, (Baxter and Murray, 2002). Ainsi, de nombreuses voies afférentes sensorielles y convergent, ainsi que des projections venant du cortex préfrontal médian et de l'hippocampe. Les neurones de projection du BLA projettent majoritairement sur le noyau central de l'amygdale, la partie shell du Nac, le noyau du lit de la strie terminale (BNST) et l'hippocampe.

Le cortex préfrontal (CPF) est le siège des fonctions exécutives. Il reçoit une innervation DA en provenance de l'ATV par la voie mésocorticale. Il projette des efférences glutamatergiques en retour sur les neurones dopaminergiques de l'ATV, ainsi que sur le Nac (pour revue, (George and Koob, 2010). Ses fonctions au sein du système de récompense consistent à réguler la valeur motivationnelle des stimuli, à contrôler la sortie comportementale et à déterminer l'intensité de la réponse la plus adaptée aux stimuli détectés.

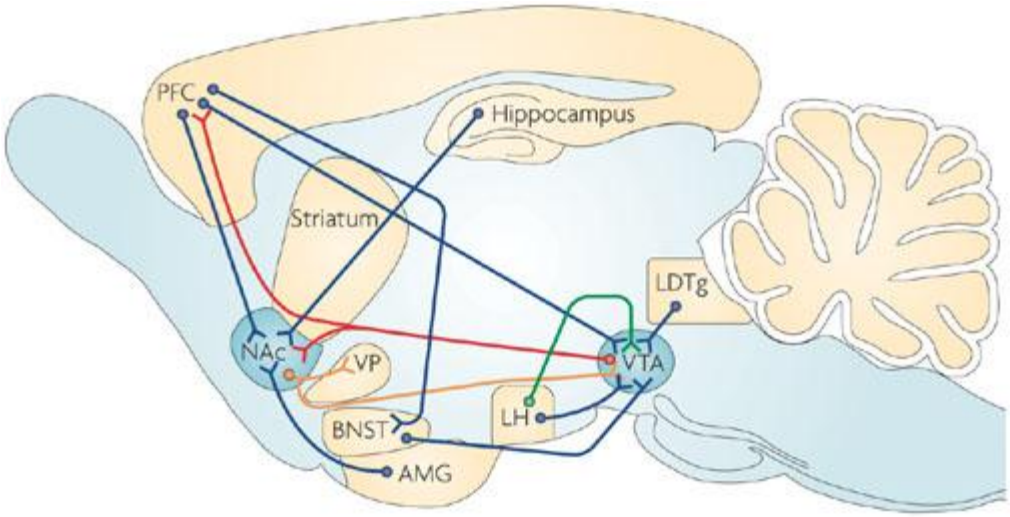


Figure 8 : Représentation schématique du système de récompense

Représentation schématiques des principales afférences sur le Nac et l'ATV

La voie principale du circuit de récompense est constituée d'un faisceau de neurones dopaminergiques (en rouge) reliant l'ATV et le Nac. L'activité de cette voie peut être modulée au niveau de l'ATV par les afférences glutamatergiques (en bleu) provenant du BNST et du CPF et par les afférences GABA (en orange) provenant du Nac ainsi que par les interneurones GABA présents dans l'ATV.

Nac, noyau accumbens ; VTA, aire tegmentale ventrale ; AMG, amygdala ; BNST, noyau du lit de la strie terminale ; LDTg, noyau tegmental laterodorsal ; LH, hypothalamus lateral; PFC, cortex prefrontal; VP, pallidum ventral.

(D'après Kauer et Malenka, 2007)

I.F. Récompense naturelle : la nourriture

Le SEC joue donc un rôle dans les propriétés motivantes de la nourriture palatable. L'inhibition des récepteurs CB1 par administration systémique d'un antagoniste bloque l'acquisition de la préférence de place conditionnée pour la nourriture (Chaperon and Thiebot, 1999) et diminue la motivation persistante pour la nourriture sucrée dans un modèle de rechute induite par la présentation d'un stimulus précédemment associé à la prise de sucrose (De Vries et al., 2005). Cependant l'augmentation des niveaux d'AEA dans le cerveau par l'inhibition génétique ou pharmacologique de la FAAH ne modifie pas la prise alimentaire.

I.F.1. Récompenses pharmacologiques : les drogues d'abus

Chez l'homme comme chez l'animal, le SEC et plus particulièrement le récepteur CB1 sont très rapidement impliqués dans le contrôle des récompenses pharmacologiques (pour revue voir (Solinas et al., 2007). D'une part, les récepteurs CB1 sont responsables des effets renforçants des cannabinoïdes naturels tel que le THC ou de synthèse tels que WIN 55,212-2 et HU-210. D'autre part, les récepteurs CB1 semblent contrôler les effets récompensants de nombreuses drogues non-cannabinoïdes telles que l'héroïne, l'alcool et la nicotine.

Les éléments qui posent la question du rôle prédominant du SEC, dans le développement et la persistance de la dépendance à différentes drogues d'abus, sont les suivants : i) les drogues d'abus augmentent les niveaux extracellulaires d'eCB (AEA et/ou 2-AG) dans les structures du système de récompense (ATV et Nac) (Gonzalez et al., 2002; Caille et al., 2007) et ii) les eCB participent aux processus de plasticité à long terme au sein de nombreux circuits neuronaux impliqués dans les effets motivationnels persistants des drogues (Ross and Peselow, 2009).

Enfin, le SEC est également impliqué dans les propriétés incitatives des drogues et de stimuli associés à la prise de drogue. En effet, la réinstallation du comportement de recherche de drogue peut être initiée par l'administration systémique aigue d'un agoniste des récepteurs CB1 et à l'inverse, bloquée par un antagoniste des récepteurs CB1 (De Vries et al., 2001). Tous ces éléments suggèrent fortement le SEC comme une cible privilégiée pour le développement de traitements des dépendances aux drogues d'abus.

I.F.1.a Opiacés

Il existe de nombreuses similarités entre le système opioïde, la cible des opiacés tels que la morphine ou l'héroïne, et le SEC ; ce qui a rapidement amené les recherches sur l'interaction entre ces 2 systèmes. Tout d'abord, les récepteurs opioïdes *mu* et les CB1 sont exprimés de façon similaire dans les structures centrales impliquées dans le processus de récompense (Mansour et al., 1987; Herkenham et al., 1991; Rodriguez et al., 2001; Pickel et al., 2004). De plus, ils partagent une cascade de signalisation intracellulaire commune via les protéines Gi/Go qui inhibent l'activité de l'adenylate cyclase, bloquent les canaux calciques voltage-dépendants et stimulent la cascade de MAP kinase (pour revue, voir (Vigano et al., 2005). Les récepteurs CB1 jouent donc un rôle prépondérant dans l'expression des effets récompensants et motivationnels des opiacés. En effet, le blocage génétique et pharmacologique des récepteurs CB1 diminue l'auto-administration et le conditionnement de préférence de place pour les opiacés (Ledent et al., 1999; Navarro et al., 2001; Caille and Parsons, 2003; Solinas

et al., 2003). L'auto-administration intraveineuse d'héroïne chez le rat augmente spécifiquement les niveaux extracellulaires d'AEA dans le Nac alors que les niveaux de 2-AG restent stables (Caille et al., 2007). L'étude des mécanismes neurochimiques mis en jeu dans cette interaction semble indiquer que le contrôle des propriétés renforçantes des opiacés ne passe pas par une modulation CB1-dépendante de la libération de dopamine dans le Nac (Caille and Parsons, 2003). En revanche, l'administration tant périphérique que locale de SR141716A dans le Nac diminue l'auto-administration d'héroïne et la libération de GABA induite par la morphine dans le pallidum ventral (Caille and Parsons, 2006). Ces données indiquent donc que l'inhibition des effets renforçants des opiacés est sous-tendue par les récepteurs CB1 du Nac qui contrôlent les voies de projection du Nac vers le pallidum ventral.
Au niveau de la transmission synaptique, les récepteurs CB1 exercent un contrôle inhibiteur sur les transmissions glutamatergiques et GABAergiques dans le Nac et leur activation entraîne une réduction de l'excitabilité des neurones GABAergiques efférents (neurones épineux moyens)(Hoffman and Lupica, 2001). Ainsi, la formation des eCB induite par les drogues dans le Nac diminuerait la libération de GABA dans les structures innervées par le Nac, comme l'ATV et le pallidum ventral.

I.F.1.b Alcool

Tout comme le système opioïde endogène, le SEC joue également un rôle très important dans le contrôle des effets renforçants et motivationnels de l'alcool. Le blocage pharmacologique et l'ablation génétique des récepteurs CB1diminuent l'auto-administration orale (Thanos et al., 2005; Economidou et al., 2006), ainsi que la consommation d'alcool en libre accès (Freedland et al., 2001; Hungund et al., 2003; Gessa et al., 2005). A l'inverse, la consommation d'alcool en libre accès est augmentée par l'administration d'un agoniste des récepteurs CB1 (Gallate et al., 1999; Colombo et al., 2002). Dans le paradigme de conditionnement de préférence de place, les souris KO CB1 ne développent pas de préférence de place conditionnée pour le compartiment associé aux injections d'alcool (Houchi et al., 2005; Thanos et al., 2005). Ces données indiquent clairement que l'expression des effets renforçants de l'alcool nécessite l'activation des récepteurs CB1. Les études qui visent à la compréhension des substrats neurobiologiques impliqués dans cette interaction suggèrent l'implication de la transmission DA mésolimbique (Hungund et al., 2003; Perra et al., 2005; Cheer et al., 2007). En effet, les eCB semblent participer aux propriétés renforçantes de l'alcool en modulant ses effets sur l'activation de la transmission DA mésolimbique. Par ailleurs, les études de pharmacologie intracérébrale ont permis de montrer que les récepteurs

CB1 localisés dans le Nac et le cortex préfrontal permettent la modulation par les eCB des effets renforçants de l'alcool (Caille et al., 2007; Hansson et al., 2007).

I.F.1.c La cocaïne

L'implication du SEC dans le contrôle des effets renforçants de la cocaïne semble plus complexe. L'ablation génétique ou le blocage pharmacologique des récepteurs CB1 ne modifient pas la plupart des comportements induits par les injections aigues ou chroniques de cocaïne, tels que la préférence de place conditionnée et la sensibilisation locomotrice (Chaperon et al., 1998; Martin et al., 2000), l'auto-administration intraveineuse de cocaïne (Cossu et al., 2001; De Vries et al., 2001; Lesscher et al., 2005) et l'augmentation de DA induite par la cocaïne dans le Nac (Soria et al., 2005; Caille and Parsons, 2006). Ces données pourraient suggérer que l'addiction à la cocaïne n'est pas régulée par les récepteurs CB1. Cependant de nouvelles études permettent de poser une nouvelle hypothèse qui postule que les récepteurs CB1 pourraient réguler la valeur motivationnelle et incitative de la cocaïne. D'une part, une étude de voltamétrie *in vivo* permettant une analyse de la libération de DA, avec une résolution temporelle inférieure à la seconde, a mis en évidence un contrôle par les récepteurs CB1 dans la libération de DA induite par la cocaïne dans le Nac (Cheer et al., 2007). Ces pics rapides de libération coderaient la valeur incitative de la drogue (Phillips et al., 2003). D'autre part, l'administration périphérique de l'AM251 (un antagoniste des récepteurs CB1) diminue de manière dose-dépendante la charge de travail que les rats sont prêts à fournir pour obtenir la cocaïne (Xi et al., 2008) et l'ablation génétique des récepteurs CB1 diminue l'acquisition du comportement d'auto-administration intraveineuse de cocaïne (Soria et al., 2005). Enfin, toujours en accord avec cette hypothèse, il a été montré que l'administration aigüe systémique du SR141716A diminue la réinstallation du comportement de recherche de cocaïne induite par la cocaïne elle-même (De Vries et al., 2001; Filip et al., 2006) ou par la présentation d'un stimuli associé à la prise de cocaïne (Ward et al., 2009). Cependant, l'inhibition des récepteurs CB1 ne bloque pas la rechute induite par la présentation d'un stress (De Vries et al., 2001). En conclusion, les résultats concernant l'implication du SEC dans les effets des psychostimulants sont moins cohérents et suggèrent que le SEC jouerait un rôle dans la modulation des réponses conditionnées à la cocaïne plutôt que sur ses effets renforçants (Maldonado et al., 2006).

I.G. Les récepteurs CB1, une cible thérapeutique pour l'abus de récompenses naturelles et pharmacologiques

I.G.1. Approche directe : Inhibition des récepteurs CB1

L'étude de l'implication du SEC dans les différents processus comportementaux fut accélérée grâce à la synthèse du premier antagoniste CB1 : SR141716A (Rinaldi-Carmona et al., 1994). Cette découverte permit rapidement de proposer le SEC comme une cible thérapeutique privilégiée pour de nombreuses pathologies. Des études chez l'homme ont d'abord montré que le SR141716A (Rimonabant) pouvait bloquer les effets psychologiques et cardiovasculaires de la marijuana (Huestis et al., 2001). Puis, le Rimonabant fut proposé et utilisé pour le traitement de l'obésité car il permettait de diminuer la prise alimentaire et la prise de poids (Ravinet Trillou et al., 2003; Despres et al., 2005; Kirkham, 2005; Pi-Sunyer et al., 2006; Scheen et al., 2006). De façon intéressante, la prise de poids au moment du sevrage tabagique est un facteur qui contribue grandement au faible taux de réussite des différents traitements d'aide au sevrage. Que le Rimonabant bloque à la fois les effets renforçants de la nicotine et diminue la prise alimentaire a donc ouvert sur l'utilisation de l'antagoniste des récepteurs CB1 comme aide thérapeutique pour le sevrage tabagique. Malgré un début très prometteur, les études cliniques de grandes ampleurs (STRATUS-US et STRATUS-EU) ont rapidement mis en évidence des effets délétères de cette molécule qui augmente les risques de développer des symptômes d'anxiété et de dépression (Moreira and Crippa, 2009; Nathan et al., 2011). Le 5 novembre 2008, Sanofi Aventis annonce alors l'arrêt de tous les programmes de développement du produit, pour tous les usages (Despres et al., 2005; Van Gaal et al., 2005; Pi-Sunyer et al., 2006; Scheen et al., 2006; Van Gaal et al., 2008; Moreira and Crippa, 2009). L'AM251 est un des antagonistes des récepteurs CB1 qui a été synthétisé par ailleurs (Gatley et al., 1996). Il est très similaire au SR141716A et partage sa capacité à bloquer les récepteurs CB1. Cependant, il se distingue du SR141716A de par une plus forte affinité pour les récepteurs CB1 (AM251 Ki=7.5nM vs SR141716A Ki=11.5 nM) et par une plus grande sélectivité (Lan et al., 1999). Par ailleurs, l'usage des antagonistes CB1 présente un inconvénient majeur ; les antagonistes les plus couramment utilisés (Rimonabant et AM251) fonctionnent également comme des agonistes inverses et bloquent massivement les récepteurs CB1. Ce blocage ne tient pas compte de l'activité cannabinoïde endogène et bloque massivement les récepteurs CB1 situés dans des structures où les eCB ne sont pas synthétisés. Les études sur l'effet chronique des antagonistes des récepteurs CB1 ont montré que

l'exposition prolongée aux antagonistes des récepteurs CB1 induit un comportement de type dépressif (Beyer et al., 2010) et diminue la fonctionnalité des récepteurs CB1 chez le rat (Martin-Garcia et al., 2010). Le traitement chronique avec le MK-0364 (Taranabant) diminue la densité et l'activité fonctionnelle des récepteurs CB1 dans le Nac, le striatum, l'hippocampe et l'hypothalamus alors que le traitement chronique au Rimonabant diminue seulement l'activité fonctionnelle des récepteurs CB1 dans le Nac et le striatum, sans affecter leur densité. Ces changements se produisent sur les récepteurs CB1 des structures associées avec la motivation et la récompense et ces mécanismes pourraient expliquer la présence des effets psychiatriques délétères décrits.

En conclusion : on ne peut pas bloquer de façon chronique et directe les récepteurs CB1.

I.G.2. Approche indirecte : augmentation du tonus eCB

En outre, il a é été proposé que prolonger l'action des eCB pourrait être une stratégie plus subtile pour le développement de traitements pharmacologiques basés sur la neurotransmission CB1-dépendante. En effet, les eCB sont produits et libérés « à la demande », les traitements qui réduisent la recapture et/ou la dégradation permettraient donc d'augmenter le signal eCB sur les récepteurs CB1 avec une meilleure spécificité neuroanatomique et temporelle. Deux stratégies peuvent être utilisées pour augmenter les niveaux extracellulaires d'eCB dans le cerveau : i) l'inhibition du transfert membranaire et ii) l'inhibition des enzymes spécifiques de la dégradation.

I.G.2.a Inhibition du transporteur membranaire

L'inhibition aigüe de la recapture de l'AEA induit un effet anxiolytique et antidépresseur chez le rat (Bortolato et al., 2006). Cependant cette stratégie est encore en cours developpement car la caractérisation du transporteur membranaire impliqué reste difficile. Le premier inhibiteur de transporteur étudié et le mieux connu est l'AM 404 (Beltramo et al., 1997). Son administration provoque une accumulation d'AEA et potentialise les effets de l'AEA exogène. L'AM 404 peut être dégradé par la FAAH et se comporte comme un agoniste des récepteurs vanilloïdes. Il existe une seconde série d'inhibiteurs du transporteur tels que l'UCM 707 qui présente une affinité plus importante pour le transporteur que l'AM404 (de Lago et al., 2002) et l'AM1172 qui présente une plus faible affinité mais n'interfère pas avec l'activité FAAH (Fegley et al., 2004) et permet donc une meilleure étude des processus de capture de l'AEA. Les inhibiteurs de la recapture de l'AEA semblent avoir des potentiels thérapeutiques dans le traitement de la douleur(La Rana et al., 2006), des troubles moteurs

(Fezza et al., 2002; Fernandez-Espejo and Galan-Rodriguez, 2004) et de l'anxiété (Bortolato et al., 2006).

I.G.2.b Inhibition de la dégradation

L'augmentation du tonus 2-AG fut peu étudiée avant la mise au point du JZL184, un inhibiteur de la MAGL (Long et al., 2009a). L'administration aigüe de JZL184 provoque l'apparition de la tétrade cannabinoïde confirmant que le 2-AG module les différents comportements associés avec la pharmacologie cannabinoïde et l'activation des récepteurs CB1 (Long et al., 2009b). Rapidement, des études démontrent les problèmes liés à l'administration chronique du JZL184 qui entraine le développement d'une dépendance physique, la diminution de la plasticité synaptique dépendante des eCB et une désensibilisation des récepteurs CB1 (Schlosburg et al., 2010). Clairement, l'ensemble de ces données indique que le 2-AG joue un rôle prédominant dans le contrôle des comportements dépendants des récepteurs CB1. En revanche, l'augmentation des niveaux extracellulaires du 2-AG produit trop d'effets secondaires indésirables pour l'élaboration de nouveaux traitements chroniques.

L'inhibition de l'enzyme de dégradation de l'AEA passe par l'inhibition de l'enzyme spécifique FAAH (fatty acid amide hydrolase). Parmi les inhibiteurs sélectifs de la FAAH, l'URB597 est la molécule la plus utilisée (pour revue, voir (Piomelli et al., 2006). Cet inhibiteur irréversible, entraine l'inhibition de l'hydrolyse de l'AEA mais également de ligands non cannabinoïdes comme l'oleoyletholamide (OEA) et le palmitoethanolamide (PEA). L'URB597 inhibe l'enzyme de dégradation de la FAAH de façon dose-dépendante et la moitié de l'effet maximum est observé pour la dose de 0.15mg/kg. Une fois injecté l'URB597 (0.3mg/kg, ip) agit en moins de 15 minutes et ses effets persistent plus de 12 heures (Piomelli et al., 2006). Cette molécule possède également des propriétés anxiolytiques et antidépressives sans toutefois provoquer les effets caractéristiques des cannabinoïdes qui activent directement les récepteurs CB1 (Kathuria et al., 2003). De plus, cette molécule ne possède pas de propriétés renforçantes, ainsi l'administration aigüe systémique d'URB597 n'induit ni préférence de place conditionnée, ni dépendance physique, et ne présente pas de propriétés renforçantes car elle n'induit pas d'auto-administration intraveineuse chez le primate (Justinova et al., 2008). L'administration chronique d'URB597 à l'âge adulte permet de reverser l'état dépressif induit par une exposition au THC à l'adolescence (Realini et al., 2011). En conclusion, l'enzyme de dégradation de l'AEA semble être une cible idéale pour moduler de façon plus fine le SEC ; l'inhibiteur de la FAAH possède un potentiel

thérapeutique intéressant pour le traitement de nombreuses pathologies. De plus, contrairement aux antagonistes, il semble que l'usage chronique de l'inhibiteur de la FAAH soit sans conséquences délétères. La proposition de l'inhibiteur de l'AEA comme traitement de la dépendance nicotinique pendant la période d'abstinence semble donc particulièrement pertinente.

II. Implication du système endocannabinoïde dans le contrôle de la dépendance tabagique

II.A. La nicotine

La nicotine est la principale substance incriminée dans les propriétés additives du tabac (Stolerman and Jarvis, 1995) et contribue largement à la chronicité de la consommation du tabac. Elle induit un effet pharmacologique central et périphérique en agissant sur les récepteurs nicotiniques cholinergiques (nACh R). Dans cette étude nous nous intéresserons aux effets centraux de la nicotine.

II.A.1. Les récepteurs nicotiniques

Les récepteurs nicotiniques cholinergiques (nACh R) appartiennent à la superfamille des canaux ioniques activés par des ligands. Ils sont composés de 5 sous-unités organisées de manière symétrique autour d'un canal ionique. Les analyses biochimiques ont permis de déterminer que les nAChR sont des récepteurs canaux homo- ou hétéro-pentamères transmembranaires de poids moléculaire 350 kD. Cette proteine pentamérique peut être formée à partir de quatre types différents de sous-unités nommées α, β, γ et δ en fonction de leur poids moléculaire (Weill et al., 1974). Chez les mammifères, il existe neuf isoformes de la sous-unité α (α2-α10) et trois isoformes de la sous-unité β (β2-β4) (Sargent, 1993; Corringer et al., 2006; Markou, 2008). Plusieurs combinaisons sont possibles et confèrent différentes propriétés fonctionnelles aux récepteurs. Les nAChRs hétéromériques neuronaux sont généralement constitués de deux types de sous-unités, on observe souvent des combinaisons de 2 sous-unités α et 3 sous unités β et les nAChR homomériques sont souvent constitués de 5 sous-unités α7 ou α9.

L'hétérodimére α4β2 et l'homomère α7 sont les deux principaux types de nAChR du SNC, ils possèdent respectivement une haute affinité et une faible affinité pour la nicotine (Couturier et

al., 1990; McGehee et al., 1995). L'administration de nicotine à des concentrations sub-micromolaires (équivalentes aux concentrations obtenues par les fumeurs), active à la fois les nAChRs α4β2 et α7, mais les α4β2 se désensibilisent en quelques minutes contrairement aux α7 qui restent ainsi disponibles pour l'activation (Mansvelder and McGehee, 2002; Wooltorton et al., 2003). L'activation de ces récepteurs canaux permet le passage de cations (en particulier Na+ et Ca+) à l'origine de la dépolarisation de la membrane plasmique (McGehee et al., 1995) qui se traduit par une excitation neuronale et par l'activation d'autres canaux voltage-dépendants. D'autres part, l'entrée de calcium dans la cellule peut agir sur les cascades intracellulaires participant ainsi à la régulation de certains gènes.

Il existe trois états conformationnels des nAChR : inactif (au repos), actif (ouvert) et désensibilisé (Edelstein and Changeux, 1998). Lors de sa fixation sur les nAchR, la nicotine stabilise l'état ouvert (au moins de façon transitoire) et provoque l'entrée de cations. Sa présence continue conduit à la fermeture du canal et induit la désensibilisation du récepteur (Changeux et al., 1998).

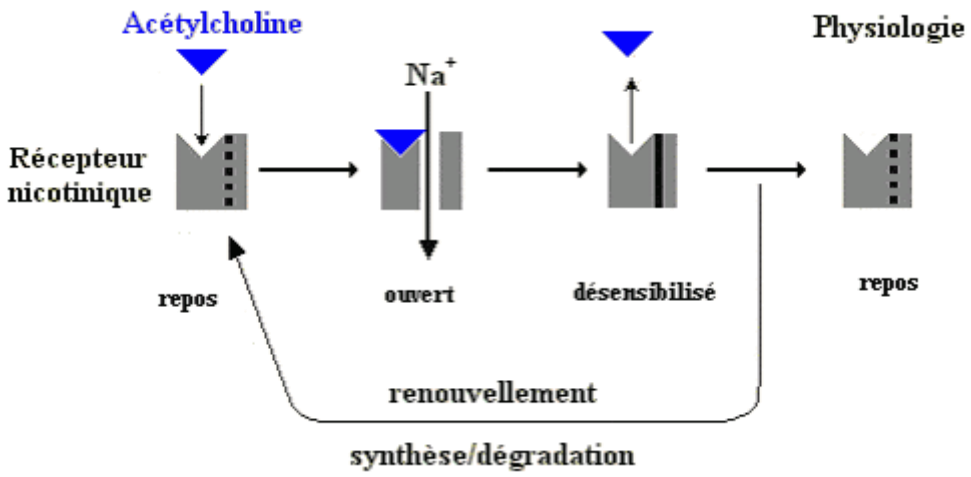


Figure 9 : Représentation schématique de la structure du récepteur à l'acétylcholine.

Le récepteur nicotinique à l'acétylcholine (nAChR) est un récepteur transmembranaire constitué de 5 sous-unités. L'activation du nAChR par un agoniste, entraine l'ouverture rapide d'un canal cationique et permet l'entrée de Na+, K+ et dans certains cas de Ca2+ à l'origine de la dépolarisation du neurone.

II.A.2. Localisation des récepteurs nicotiniques au sein du Système Nerveux Central

Les récepteurs nicotiniques sont très largement exprimés au niveau neuronal, on les trouve au niveau somatique, synaptique ou dendritique. Les récepteurs α4β2 sont les récepteurs nACh les plus exprimés dans le SNC et sont localisés dans le cortex, le striatum, le colliculus supérieur, le cervelet et le thalamus et l'ATV (Hill et al., 1993; Turner and Kellar, 2005; Gotti et al., 2006). Les sous-unités α4 et β2 peuvent parfois être assemblées avec la sous-unité α5 (Zoli et al., 2002).

Les sous-unités α3 et β4 se trouvent principalement dans la glande pinéale, l'habenula médiane, le noyau inter-pédonculaire, le noyau du tractus solitaire et le noyau moteur du nerf vague (Dineley-Miller and Patrick, 1992). On trouve l'ARNm des sous-unités α6 et β3 dans la substance noire pars compacta, l'ATV, l'aire rétrorubrale (A8) et le locus coeruleus (Deneris et al., 1989; Klink et al., 2001).

L'homopentamère α7 est également exprimé de manière diffuse dans le cerveau. Chez le rat, on le trouve dans le cortex, l'hippocampe le noyau supra optique, l'amygdale, le bulbe olfactif et le hippocampe (Seguela et al., 1993)

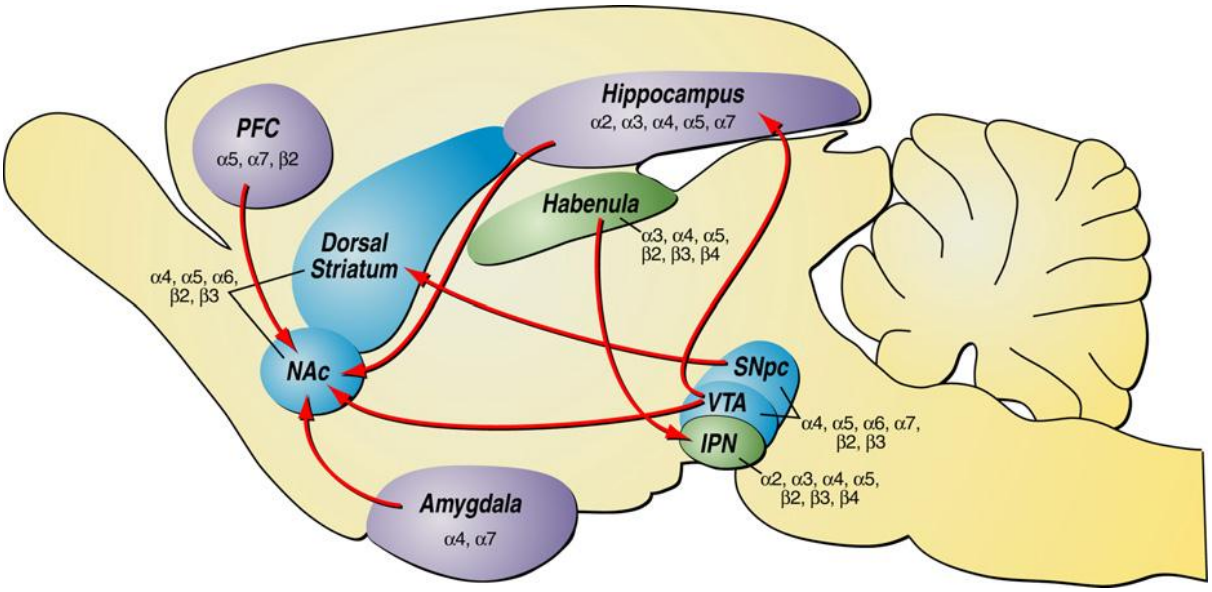


Figure 10 : **Localisation des ARNm et des protéines de différentes sous-unités des récepteurs nACh dans les régions importantes pour l'expression des effets renforçants de la nicotine**. On trouve une forte densité d'expression de sous-unités nAChR dans l'aire tegmentale ventrale (ATV) et dans la substance noire pars compacta (SNpc) deux sites majeurs des projections DA ainsi que dans les structures recevant ces afférences DA telles que le noyau accumbens (Nac), le noyau du lit de la strie terminale, le cortex préfrontal et l'hippocampe. Les sous-unités nAChR sont également exprimées dans d'autres sites impliqués dans la régulation du comportement l'AAIV de nicotine : l'habenula, le noyau pedoculopontin et l'amygdale. Les projections neuronales sont représentées par les flèches rouges (D'après Tuesta et al, 2011).

II.A.3. Rôle des différentes sous-unités du nAChR dans les effets renforçants de la nicotine

Une série d'études par inactivation génétique des différentes sous-unités a permis de déterminer le rôle respectif de chacune de ces sous-unités dans le processus de l'addiction à la nicotine. Il a été montré que les sous-unités β2 et α6 jouent un rôle important dans les effets renforçants de la nicotine. En effet, l'absence de la sous-unité β2 et α6 empêche l'acquisition du comportement d'AAIV de nicotine (Picciotto et al., 1998; Maskos et al., 2005; Pons et al., 2008) et celui-ci réapparait lorsque les sous-unités sont ré-exprimées dans l'ATV (Maskos et al., 2005; Pons et al., 2008). Dans des expériences complémentaires questionnant la contribution relative des sous-unités α4 et α6 dans les effets renforçants de l'auto-administration intra-ATV de nicotine, Exley et coll. (Exley et al., 2011) ont montré que la sous-unité α4 de l'ATV contrôle l'activité des neurones DA alors que les sous-unités α4 et α6 du Nac co-régulent la transmission DA. Les sous-unités α4, α6 et β2 de l'ATV sont nécessaires pour l'expression du comportement d'auto-administration (Maskos et al., 2005). De plus, l'absence de la sous-unité β2 bloque la préférence de place induite par la nicotine (Stolerman et al., 2004; Walters et al., 2006). La délétion de la sous-unité α5 et la surexpression de la sous-unité β4 augmente l'auto-administration de nicotine, suggérant un effet modulateur de ces sous unités sur l'effet récompensant de la nicotine (Changeux, 2010). Toutes ces observations indiquent que les nAChR contenant les sous-unités α4, α5,α6, β2, β4 sont impliqués dans les effets renforçants de la nicotine (Picciotto et al., 1998; Tapper et al., 2004; Changeux, 2010). Les données concernant la sous-unité α7 sont plus ouvertes à discussion. En effet, l'absence de la sous-unité α7 ne modifie pas le CPP pour la nicotine

(Stolerman et al., 2004; Walters et al., 2006) et n'entraine pas de perte totale de l'auto-administration intra-VTA (Besson et al., 2011). En déduction de cette dernière étude, la sous-unité α7 située dans l'ATV potentialise les effets renforçants de la nicotine via une libération accrue de la DA dans le Nac (Besson et al., 2011).

II.A.4. Effet de l'exposition à la nicotine sur les récepteurs nACh

Chez les fumeurs, la consommation d'une cigarette désensibilise rapidement les nAChR (Dani and Heinemann, 1996). Par ailleurs, l'analyse neuroanatomique du cerveau de fumeurs et d'animaux exposés de façon chronique à la nicotine a permis de montrer qu'une exposition à long-terme entraine une augmentation du nombre de récepteurs nACh (Marks et al., 1992; Perry et al., 1999), qui semble s'opposer au processus de désensibilisation des récepteurs. Ce phénomène complexe reste encore mal compris bien qu'il semble jouer un rôle crucial dans l'établissement de la dépendance nicotinique et dans la difficulté à s'abstenir de fumer. Il concerne principalement les récepteurs contenant la sous unité β2, et plus particulièrement les récepteurs de type α4β2 (Gentry and Lukas, 2002; Nguyen et al., 2004; Staley et al., 2006; Nashmi et al., 2007). Le nombre de récepteurs α7 est également augmenté mais dans une moindre mesure que le nombre de récepteurs α4β2, certainement du fait de leur plus faible affinité pour la nicotine (Rasmussen and Perry, 2006). Toutefois, les compensations observées dépendent également de la procédure utilisée pour administrer la nicotine. Par exemple, le nombre de récepteurs α6 est augmenté dans le modèle d'auto-administration de nicotine chez le rat (Parker et al., 2004) mais il est diminué lors de l'administration chronique de nicotine via une mini pompe osmotique chez le rat et la souris (Lai et al., 2005; Mugnaini et al., 2006). Pour la recherche sur l'addiction sur les modèles animaux, il est donc important de choisir un modèle d'exposition à la nicotine entrainant des phénomènes de sensibilisation/désensibilisation multiples comme chez l'homme.

II.A.5. Effet de la nicotine sur le système de récompense

La nicotine, comme toutes les récompenses naturelles et pharmacologiques, usurpe le système de récompense (présentation du système, cf. Introduction chapitre I.E.1) (Picciotto and Corrigall, 2002). L'administration systémique de nicotine entraîne une augmentation de l'activité des neurones dopaminergiques de l'ATV (Mansvelder et al., 2002) et une augmentation de la libération de DA extracellulaire dans le Nac (Pontieri et al., 1996). L'effet récompensant de la nicotine résulte du passage de l'activité électrique des neurones de l'ATV

d'un mode de décharge tonique à un mode de décharge phasique en bouffées (Mansvelder et al., 2003), ce qui augmente ainsi fortement la libération de DA dans le Nac. (Di Chiara, 2000). La nicotine module l'activité de la voie dopaminergique mésolimbique de façon directe, en agissant sur les nAChR α4β2, localisés sur les corps cellulaires des neurones DA de l'ATV (Charpantier et al., 1998; Klink et al., 2001). Elle exerce également un contrôle indirecte en stimulant les nAChR α7 localisés sur les terminaisons glutamatergiques de l'ATV (Jones and Wonnacott, 2004; Gao et al., 2010; Jin et al., 2011) et les récepteurs α4β2 localisés sur les interneurones GABA (Charpantier et al., 1998; Klink et al., 2001). La rapide désensibilisation des récepteurs α4β2 localisés sur les neurones DA et surtout sur les interneurones GABA (Mansvelder et al., 2002) accentue la décharge phasique en bouffées provoquée par les afférences glutamatergiques (Schilstrom et al., 2003; Pidoplichko et al., 2004).

II.B. Addiction à la nicotine

II.B.1. L'étude de la dépendance à la nicotine chez l'homme

L'addiction à la nicotine est un phénomène complexe. D'une part, la nicotine est l'une des drogues les plus fréquemment consommées et les plus addictives. En effet, la consommation moyenne d'un fumeur est de 6,8 cigarettes et 21% des fumeurs réguliers ont une consommation supérieure à 10 cigarettes par jour. En conséquence, la nicotinémie augmente régulièrement pendant les 6 à 8 heures de consommation et culmine ensuite en plateau jusqu'à la dernière cigarette de la journée. Au cours de la journée, alors que la nicotinémie augmente, un nombre croissant de récepteurs se désensibilise. Chez les fumeurs chroniques, on observe le maintien entre chaque cigarette d'une concentration de nicotine suffisante pour désactiver les récepteurs nACh. La nuit en absence de nicotine, ces récepteurs regagnent leurs propriétés normales. Le cycle nycthéméral de désensibilisation-resensibilisation est ainsi «idéal» pour entretenir la dépendance au quotidien (Schneider et al., 1984; Molander et al., 2000).

II.B.2. Modèles animaux de dépendance à la nicotine

Il existe plusieurs façons d'induire une dépendance à la nicotine par i) des injections sous-cutanées répétées, ii) implantation d'une mini-pompe osmotique à diffusion lente délivrant la nicotine de façon continue sur plusieurs semaines et iii) prise volontaire de nicotine par auto-

administration intraveineuse. Cependant, de nombreuses études ont mis en évidence que le protocole d'auto-administration intraveineuse (AAIV) de nicotine présente la meilleure validité dans la modélisation des différents processus de l'addiction aux drogues (O'Connor et al., 2011)

L'AAIV de nicotine a été démontrée chez de nombreuses espèces (Stolerman, 1999) : chez le rat (Corrigall and Coen, 1989; Tessari et al., 1995; Shoaib et al., 1997; Valentine et al., 1997; Donny et al., 1999), chez la souris (Martellotta et al., 1995; Stolerman et al., 1999; Fowler and Kenny, 2011), chez le singe (Goldberg et al., 1981; Wakasa et al., 1995)et chez l'homme (Harvey et al., 2004; Sofuoglu et al., 2008).

II.B.2.a Avantages du modèle d'auto-administration intraveineuse de drogue

L'AAIV permet d'étudier les différents facteurs de vulnérabilité aux drogues et plus spécifiquement de rechercher les substrats neuroanatomiques impliqués. Tous les individus ne sont pas égaux face aux drogues et certains traits comportementaux sont préférentiellement corrélés à une consommation abusive de drogue Par exemple, le trait d'impulsivité est associé avec une plus grande vulnérabilité à développer une addiction pour la cocaïne (Belin et al., 2008; Molander et al., 2010) et à la nicotine (Diergaarde et al., 2008; Diergaarde et al., 2010).

L'étude du comportement d'AAIV chez le rat permet l'expression des différences individuelles ; en effet chaque animal est libre de consommer la quantité de nicotine qui lui convient avec le pattern de consommation qui lui convient. En analysant ces différents paramètres à postériori, nous avons la possibilité de faire la corrélation entre le type de consommateurs, la persistance de la motivation pour la drogue et les modifications comportementales lors d'un suivi longitudinal plus complet.

L'AAIV de nicotine permet de modéliser au mieux la cinétique d'absorption et de dégradation de la nicotine absorbée par voie respiratoire chez le fumeur. Lors de l'injection intraveineuse (0.3mg/kg), la nicotine atteint rapidement le cerveau en 7 secondes et induit un taux plasmatique de nicotine entre 40-120 ng/kg proche des niveaux observés chez les fumeurs (Shoaib and Stolerman, 1999).

Le modèle d'AAIV permet également de mesurer l'importance de la prise volontaire dans les neuroadaptations induites pas la consommation de nicotine. Plusieurs études ont montré que le caractère volontaire de la prise de nicotine détermine le type de neuroadaptations engendrées dans les structures du système de récompense. Une étude mesurant le seuil d'excitabilité du système de récompense au moyen de l'auto-stimulation intracérébrale a mis en évidence que la consommation volontaire de nicotine chez le rat augmente la sensibilité du

système pendant plusieurs jours (Kenny and Markou, 2006). Par ailleurs, une étude d'électrophysiologie *in vivo* a montré que les rats qui s'auto-administrent de la nicotine pendant 2 mois, présentent une hyperactivité des neurones DA de l'ATV (Caille et al., 2009). De même, la consommation volontaire de nicotine augmente la densité des récepteurs nACh α4β2 dans l'ATV et le noyau dorsolatéral géniculé du thalamus (Metaxas et al., 2010). En revanche, ces neuroadaptations ne sont pas observées chez les rats qui reçoivent la nicotine de manière passive (Caille et al., 2009; Metaxas et al., 2010).

II.B.2.b Limites du modèle d'auto-administration intraveineuse de drogue

Dans la plupart des laboratoires la mise en place de l'AAIV est difficile à obtenir et nécessite des conditions expérimentales particulières. Dans de nombreuses expériences, l'apprentissage de l'AAIV de nicotine est facilité par un pré-entrainement pour un autre type de renforçateur (souvent la nourriture) (Liu et al., 2007; Shram et al., 2008). Mais cette procédure présente un biais d'apprentissage de l'AAIV. Dans notre laboratoire, l'AAIV est facilitée par une alimentation restreinte, en donnant la ration journalière de nourriture 1 à 2 heures après chaque séance. L'acquisition de l'AAIV de nicotine est facilitée si la réponse opérante demandée au rat nécessite une réponse comportementale proche du répertoire naturel de l'animal. Ainsi l'animal apprendra plus facilement le comportement d'AAIV si l'injection de nicotine nécessite d'introduire son museau dans un trou percé dans la paroi de la cage (nose poke) au lieu d'appuyer sur un levier (Shoaib et al., 1997; Clemens et al., 2010). L'acquisition et le maintien de l'AAIV de nicotine sont également facilités par la présence de stimuli associés à l'injection de nicotine (généralement un stimulus lumineux) (Caggiula et al., 2001; Raiff and Dallery, 2009). Ces stimuli peuvent alors progressivement acquérir une valeur motivationnelle qui leur permet d'induire et de maintenir le comportement de recherche de drogue ou encore de réinstaller ce comportement après une période d'extinction (Goldberg et al., 1983; Le Foll et al., 2008). Par ailleurs, la fourchette de doses efficaces pour l'AAIV est relativement restreinte et se situe entre 0.01mg/kg et 0.075mg/kg. Chez le rat, la dose la plus communément utilisée est de 0.03mg/kg par injection, dose qui correspond à la quantité de nicotine présente dans une cigarette (Valentine et al., 1997; Shoaib and Stolerman, 1999).

Malgré ces difficultés, les conditions expérimentales mises en œuvre au laboratoire nous permettent de réaliser l'AAIV de nicotine en routine et d'obtenir un bon taux de discrimination et un niveau de prise relativement élevé (Guillem et al., 2005, 2006; Caille et al., 2009; Clemens et al., 2009; Clemens et al., 2010).

II.B.2.c Les différentes procédures dans le modèle d'AAIV de drogue pour évaluer les étapes du processus de l'addiction à la nicotine

Les propriétés renforçantes de la nicotine permettent d'obtenir un comportement opérant stable et persistant dans le temps. Pendant l'acquisition, le rat apprend progressivement à mettre en œuvre un comportement opérant pour obtenir la nicotine et lors de l'augmentation du FR, il adapte son comportement pour recevoir une dose constante de nicotine.

L'étude des outils pharmacologiques pour la maintenance de l'AAIV renseigne sur l'interaction entre un système et le pouvoir renforçant de la drogue. Afin d'étudier l'effet d'une intoxication volontaire, plusieurs protocoles d'exposition à la nicotine ont été proposés : avec un accès court (1 à 2 heures) (Caille et al., 2009; Clemens et al., 2009; Clemens et al., 2010) ou un accés long (12 ou 23h) (Kenny and Markou, 2006; Chen et al., 2008). La comparaison entre une exposition à une AAIV d' accés court (1h) et une AAIV d' accés long accès (12h) indique que, quelque soit la durée de la séance d'AAIV la consommation volontaire quotidienne de nicotine provoque une augmentation de la sensibilité du système de récompense et celle-ci persiste au moins 36 jours après la dernière séance d'AAIV (Kenny and Markou, 2006). De plus, contrairement à la cocaïne pour laquelle l'accès prolongé induit une augmentation progressive de la consommation au cours des séances (Ahmed and Koob, 1998; Paterson and Markou, 2003), l'exposition prolongée à la nicotine n'entraine pas d'escalade de la consommation (Paterson and Markou, 2004; Le Foll et al., 2007).

Le puissant pouvoir addictif de la nicotine reflète une interaction complexe entre la drogue et le contexte dans laquelle elle est délivrée. On appelle rechute l'expression durant l'abstinence, du comportement de recherche de drogue malgré l'absence de drogue délivrée. Elle peut être causée par différents facteurs tels que : l'injection de drogue (Chiamulera et al., 1996; Lindblom et al., 2002; Andreoli et al., 2003; Forget et al., 2009), l'exposition à un stimulus associé à la prise de drogue (Caggiula et al., 2001; LeSage et al., 2004; Forget et al., 2009) et le stress (Buczek et al., 1999). L'étude des aspects motivationnels persistants de la nicotine est souvent réalisée pour développer des nouvelles stratégies thérapeutiques. Les études précliniques sur les modèles animaux utilisent souvent des protocoles courts d'exposition et testent les effets de la motivation persistante pour la nicotine 24h ou au maximum 15 jours après la dernière séance d'AAIV. Or chez l'homme, le succès des traitements anti-tabagiques nécessite un traitement chronique sur le long terme pour amener à l'abstinence définitive (Agboola et al., 2010). Il est donc absolument nécessaire de développer

chez l'animal des approches qui prennent en compte l'étude longitudinale visant à augmenter la validité d'un traitement.

II.C. Interaction entre système endocannabinoïde et système nicotinique.

D'un point de vue anatomique, il est observé une co-localisation des récepteurs CB1 et nAchR dans de nombreuses structures du SNC qui a rapidement suggéré une interaction fonctionnelle entre ces deux systèmes (Herkenham et al., 1990; Picciotto et al., 2000). . Par exemple, il a été montré que l'AEA peut inhiber le nAchR de type $\alpha 4\beta 2$ (Spivak et al., 2007; Butt et al., 2008). D'autres études montrent que l'exposition chronique à la nicotine ne modifie pas les niveaux d'expression des récepteurs CB1 (Gonzalez et al., 2002; Werling et al., 2009; Gerard et al., 2010).

D'un point de vue comportemental, la nicotine potentialise la tétrade induite par le Δ9-THC, à savoir la nicotine potentialise l'hypothermie, l'analgésie, l'hypolocomotion et les réponses anxiolytiques (Pryor et al., 1978; Valjent et al., 2002). A l'inverse le Δ9-THC diminue les manifestations somatiques et motivationnelles du sevrage nicotinique (Balerio et al., 2004). De plus, la co-administration de nicotine et de Δ9-THC potentialise l'activation cellulaire au sein des structures cérébrales fortement innervées par des afférences dopaminergiques (Valjent et al., 2002).

En conclusion, il existe une interaction manifeste entre le SEC et le système nicotinique. Je vais dans les paragraphes qui suivent m'attacher à démontrer que cette interaction très complexe, présente un intérêt pour la prise en charge thérapeutique de la dépendance nicotinique.

II.C.1. Le système endocannabinoïde et l'addiction à la nicotine

II.C.1.a Le système endocannabinoïde et les effets renforçants de la nicotine

L'exposition chronique à la nicotine par injection chez le rat, augmente les niveaux d'AEA et de 2-AG dans les aires limbiques et le tronc cérébral et les diminue dans l'hippocampe, le striatum et le cortex cérébral (Gonzalez et al., 2002). Le SEC semble jouer un rôle majeur dans la facilitation des effets renforçants de la nicotine (Cohen et al., 2005a). Les études précliniques ont montré que les antagonistes CB1 (Rimonabant et AM251) diminuent ou

bloquent totalement l'auto-administration de nicotine (Cohen et al., 2002; Shoaib, 2008). De façon surprenante, l'augmentation des niveaux d'AEA par l'inhibition de son enzyme de dégradation par l'URB597 permet également de diminuer l'acquisition de l'AAIV (Scherma et al., 2008c; Forget et al., 2009). Comme nous l'avons vu précédemment, les effets renforçants de la nicotine dépendent essentiellement de l'activation des neurones DA et de la libération de DA dans le Nac qui en découle. Donc l'hypothèse suivante a été proposée : les récepteurs CB1 exercent un contrôle sur les propriétés renforçantes de la nicotine via un contrôle de la neurotransmission DA mésolimbique. En accord avec cette hypothès , une étude de microdialyse *in vivo* a montré que l'administration systémique d'un antagoniste des récepteurs CB1 bloque la libération de dopamine dans le Nac et le BNST ,libération induite par une injection aigüe de nicotine (Cohen et al., 2002). De même, l'administration périphérique d'URB597 inhibe la libération de DA dans le shell du Na induite par la nicotine (Melis et al., 2008; Scherma et al., 2008c).

II.C.1.b Le système endocannabinoïde et les effets motivationnels de la nicotine

Chez le rat, la co-administration de THC et de nicotine à des doses inactives par elles-mêmes induit une préférence de place (Valjent et al., 2002). A l'inverse, il n'y a pas de préférence de place conditionnée induite par la nicotine en l'absence totale de récepteur CB1 comme c'est le cas chez les souris KO CB1 (Cossu et al., 2001; Castane et al., 2002), ou lors d'un prétraitement avec un antagoniste des récepteurs CB1 (Le Foll and Goldberg, 2004; Cohen et al., 2005a). Cependant, le blocage pharmacologique des récepteurs CB1 ne bloque pas l'expression de la préférence de place induite par la nicotine lorsque le test est effectué 3 semaines après le conditionnement (Forget et al., 2005). Ces données semblent indiquer que les récepteurs CB1 sont impliqués dans l'induction plutôt que dans l'expression de la préférence de place pour la nicotine; ce qui souligne l'importance de l'interaction nicotine-SEC pour favoriser l'induction des effets motivationnels de la drogue.

Le SEC interfère également avec la rechute induite par des stimuli précédemment associés à la prise de nicotine. Chez le rat, le Rimonabant diminue l'influence de ces stimuli environnementaux sur le comportement de recherche de nicotine (Cohen et al., 2005b; De Vries et al., 2005) via le CPF, le Nac shell et BLA (Kodas et al., 2007). La recherche de nicotine peut également être bloquée par l'augmentation aigue du tonus eCB via l'administration d'un inhibiteur de la dégradation de l'AEA : l'URB597 (Forget et al., 2009).

II.C.2. Le système endocannabinoïde et les réponses émotionnelles induites par la nicotine

L'exposition chronique à la nicotine n'est pas sans effet sur les réponses émotionnelles d'un individu et chez un individu dépendant ; l'abstinence à la nicotine peut entrainer l'apparition de symptômes anxieux et dépressifs chez l'homme (Hughes, 2007) et chez le rongeur (Hayase, 2007; Hughes, 2007; Hayase, 2008).

Chez le rat abstinent de la nicotine, le THC réduit les manifestations d'un état émotionnel négatif induit par le sevrage nicotinique (Balerio et al., 2004). Dans une étude chez la souris, il a été montré qu'une injection aigüe de nicotine peut, selon la dose choisie, se révéler comme anxiolytique ou anxiogène dans le modèle du labyrinthe en croix surélevé (Balerio et al., 2006). L'administration aigue de THC diminue l'effet anxiogène induit par une forte dose de nicotine mais ne modifie pas la réponse anxiolytique induite par une faible dose. L'effet anxiolytique provoqué par une injection aigue de nicotine peut être bloqué par la virodhamine (Porter et al., 2002), un eCB antagoniste des récepteurs CB1 et agoniste des récepteurs CB2 (Hayase, 2007). Cependant, cette molécule est sans effet sur l'anxiété induite par un traitement chronique (15 jours) à la nicotine. La virodhamine diminue également l'effet pro-dépresseur du traitement aigu, chronique et sub-chronique de la nicotine dans le test de la nage forcée et de la suspension par la queue (Hayase, 2007, 2008). Chez les rats KO pour les récepteurs CB1, l'absence des récepteurs ne permet pas l'expression de l'effet anxiogène et de la prise de poids produits par le sevrage de la nicotine (Bura et al., 2010). Ces données suggèrent l'implication des eCB dans la modulation des effets anxiogènes de la nicotine. Cependant, leur implication dans la modulation des effets pro-dépresseurs de la nicotine semble plus nuancée et implique certainement d'autres systèmes. Une étude récente suggère un lien entre le système sérotoninergique et le SEC dans les mécanismes qui sous-tendent les troubles émotionnels causés par l'abstinence de la nicotine (Mannucci et al., 2011). L'administration de l'AM404, un inhibiteur du transporteur de l'AEA, diminue le temps d'immobilité dans le test de la nage forcée chez les rats abstinents de la nicotine. Cet effet est bloqué à la fois, par l'administration d'un antagoniste des récepteurs CB1 et par l'admiration d'un antagoniste des récepteurs sérotoninergiques de type 5-HT1A.

En conclusion, ces données suggèrent qu'il existe une interaction entre le SEC, la nicotine et l'état émotionnel.

Le SEC qui module les propriétés renforçantes et récompensantes de la nicotine semble être une cible intéressante pour le traitement de la dépendance nicotinique, cependant les études de traitements chroniques ciblant le SEC ont mis en évidence des conséquences délétères sur l'état émotionnel.

Donc si le SEC est toujours une cible pour le traitement de l'addiction à la nicotine, il semble néanmoins crucial de continuer à étudier l'interaction entre le SEC et la nicotine sur l'état émotionnel, dans des conditions proches du traitement thérapeutique (abstinence et traitement chronique) plutôt que dans des conditions de pharmacologie aigue.

III. Objectifs de la thèse

Depuis la découverte du récepteur CB1, un nombre exponentiel de travaux de recherche se sont intéressés à l'étude du rôle modulateur du SEC sur diverses fonctions périphériques et centrales. Avec son statut de récepteur le plus représenté dans le SNC, le SEC a très vite reçu un intérêt particulier dans le traitement des désordres psychiatriques, et plus particulièrement dans le cadre des pathologies associées au dysfonctionnement du « système de récompense ».

Le Rimonabant, premier antagoniste des récepteurs CB1 synthétisé, fut proposé et utilisé pour le traitement de l'obésité car il permettait de diminuer la prise alimentaire et la prise de poids. De façon intéressante, la prise de poids au moment du sevrage tabagique est un facteur qui contribue grandement au faible taux de réussite des différents traitements d'aide au sevrage. Que le Rimonabant bloque à la fois les effets renforçants de la nicotine et diminue la prise alimentaire a donc ouvert sur l'utilisation de l'antagoniste des récepteurs CB1 comme aide thérapeutique pour le sevrage tabagique (Fernandez and Allison, 2004). Le blocage des récepteurs CB1 se révélet très efficace pour diminuer à la fois l'auto-administration de nicotine (Cohen et al., 2002; Shoaib, 2008), le développement et l'expression du conditionnement préférence de place induite par la nicotine (Le Foll and Goldberg, 2004; Cohen et al., 2005a). Les substrats neurobiologiques qui sous-tendent les effets des antagonistes CB1 sur les propriétés renforçantes de la nicotine restent encore à déterminer. La caractérisation des structures impliquées est essentielle car elle permettra ensuite d'aller plus avant dans la compréhension des mécanismes régissant l'interaction entre le SEC et la nicotine.

Paradoxalement, l'inhibition aiguë de la transmission via les récepteurs CB1 comme l'augmentation aiguë de la disponibilité de l'AEA, un agoniste des récepteurs CB1, réduisent

efficacement les propriétés renforçantes de la nicotine (Cohen et al., 2002; Le Foll et al., 2008; Scherma et al., 2008c; Shoaib, 2008; Forget et al., 2009) et ses propriétés incitatives chez le sujet abstinent (Cohen et al., 2005a; Le Foll et al., 2008; Forget et al., 2009). La critique majeure de ces études précliniques est : l'interêt centré sur l'effet aigu des molécules, model éloigné des conditions thérapeutiques réelles qui doivent assurer une abstinence à long terme. Mais, si les études précliniques ont révélé l'intérêt de cibler le SEC dans le traitement des pathologies liées à la dépendance alimentaire ou nicotinique, les études cliniques ont mis en évidence l'apparition d'effets secondaires indésirables sur l'état émotionnel des sujets (Cahill and Ussher, 2007; Nissen et al., 2008). Par ailleurs, l'inhibition chronique des récepteurs CB1 conduit également à l'apparition d'un phénotype de type dépressif chez des animaux qui n'ont aucune autre histoire pharmacologique (Beyer et al., 2010). D'une part, l'ensemble de ces données soulève la nécessité d'étudier l'effet de la modulation *chronique* du SEC sur les propriétés incitatives de la nicotine chez le sujet abstinent. D'autre part, il est également important de développer des études dans lesquelles l'histoire de dépendance met en œuvre une intoxication de longue durée, comme c'est souvent le cas chez le toxicomane ; et d'examiner les conséquences du traitement potentiel sur le profil affectif qui joue un rôle majeur dans les processus de sortie de la toxicomanie.

Objectifs spécifiques

- **Le premier objectif** était d'identifier les structures impliquées dans la diminution des propriétés renforçantes de la nicotine par les antagonistes CB1. Pour cela, nous avons réalisé des administrations locales d'un antagoniste des récepteurs CB1, l'AM251, dans trois structures impliquées dans l'expression des effets renforçants de la nicotine: l'ATV, le Nac et le BNST.

- **Le deuxième objectif** était d'examiner l'effet de l'augmentation *chronique* de la disponibilité de l'AEA, via l'inhibition de son enzyme de dégradation, sur les propriétés incitatives de la nicotine et des stimuli associés à la prise de nicotine chez les rats abstinents.

- **Le troisième objectif** était d'analyser les conséquences de l'augmentation *chronique* de l'AEA sur le profil émotionnel des rats abstinents de la nicotine.

- **Le quatrième objectif** était de déterminer si les effets anxiogènes provoqués par l'inhibition de l'enzyme de dégradation de l'AEA chez les rats abstinents étaient dépendants de la transmission eCB via les récepteurs CB1.

MATÉRIEL & MÉTHODES

I. Animaux et conditions d'élevage

Nous avons utilisé des rats mâles, de souche Sprague Dawley OFA (Charles Rivers, France) pesant entre 175 et 200g à leur arrivée au laboratoire. Les animaux sont dans des cages collectives par 3 ou 4 en fonction des besoins de l'expérience. Ils sont placés dans une animalerie à température (22±1°C) et humidité (65±10%) régulées et sont soumis à un cycle inverse lumière/obscurité (12h /12h, obscurité de 9h30 à 21h30). Le rat étant un animal nocturne, toutes les expériences sont réalisées durant la phase nocturne assurant ainsi un degré de vigilance optimale. Toutes les expériences ont été réalisées en accord avec les directives françaises (décret n°87-848, 19 Octobre 1978) et européennes (86/609/EEC, 24 novembre 1986) concernant l'utilisation des animaux de laboratoire.

II. Drogues

II.A. Nicotine

Lors de l'intoxication chronique par auto-administration intraveineuse, la nicotine hydrogène tartrate (1g de nicotine base = 2.85 g de nicotine tartrate) (*Sigma Aldrich, France*) est dissoute dans du NaCl à 0.9% et administrée par voie intraveineuse (iv) dans un volume de 0.1 ml délivré en 3 secondes. Pour les autres expériences, la nicotine hydrogène tartrate est dissoute dans du NaCl à 0.9% ; le PH est ajusté à 7.4 avant l'administration sous-cutanée dans les tests de rechute et de l'intoxication chronique. Toutes les concentrations mentionnées dans les expériences sont exprimées en µg nicotine base/kg.

II.B. Pharmacologie cannabinoïde

II.B.1. Antagoniste des récepteurs CB1 : l'AM251 [1-(2,4-dichlorophenyl)-5-(4-iodophenyl)-4-methyl-N-(1-piperidyl) pyrazole-3-carboxamide.

Pour les injections intracérébrales et intraveineuses, l'AM251 (*Tocris, Grande-Bretagne)* est dissout dans un véhicule composé d'un mélange à 1.25% de Cremophor (*Sigma, France*) et d'une solution à 0.05% de diméthyl sulfoxide (*Sigma, France*). Les concentrations sont ensuite ajustées avec du NaCl 0.9% quand le composé est administré par voie intraveineuse ou avec une solution de Ringer lorsque l'AM251 est injecté par voie intracérébrale.

Pour les injections intrapéritonéales (ip), l'AM251 est dissout dans une solution de 5% de Cremophor, 5% d'éthanol 95% et les concentrations sont ajustées avec du NaCl à 0.9%.

II.B.2. Inhibiteur de l'enzyme de dégradation de l'anandamide : l'URB59 [3-(3-carbamoylphenyl)phenyl] N-cyclohexylcarbamate.

L'URB597 est dissout dans une solution composée de 5% de Cremophor, 5% d'Ethanol 95% et les concentrations sont ajustées avec du NaCl à 0.9%.

III. Intoxication à la nicotine

III.A. Auto-administration intraveineuse

III.A.1. Chirurgie : cathétérisation de la veine jugulaire

Les animaux sont anesthésiés avec une mixture de xylazine (7.5 mg/kg) et de ketamine (75mg/kg) administrée par voie intrapéritonéale (ip). Un cathéter est implanté à demeure dans la veine jugulaire droite. L'extrémité du cathéter est introduite dans la veine et fixée par des fils de suture. L'autre extrémité est acheminée sous la peau et ressort au niveau du dos de l'animal. Afin d'éviter toute infection, une solution antibiotique (Ampiject,*Coophavet, France*) est administrée une fois par jour pendant la période post-opératoire. Les animaux disposent au minimum de cinq jours de récupération avant le début des expériences. Avant et après chaque séance d'auto-administration, une solution saline héparinée est administrée aux rats (280 IU/ml; 0.2ml/rat) afin de prévenir une obstruction du cathéter par le sang coagulé.

III.A.1.a Dispositif expérimental

Les cages d'auto-administration sont placées dans des enceintes closes insonorisées afin de réduire les nuisances visuelles et sonores. Les cages (30cm x 40cm x 37 cm, *Imetronic, France*) sont constituées de deux panneaux opérants opaques sur les côtés droits et gauche, de 2 murs en plexiglas transparents à l'avant et à l'arrière (Figure 11). Chaque panneau opérant est équipé en son milieu d'un orifice muni de cellules photoélectriques (1) et surmonté d'un spot lumineux (2). Lors des séances d'auto-administration, le cathéter de l'animal est relié via un tube en tygon (3) protégé par un ressort métallique, à une seringue de 10 ml contenant la drogue en solution. Cette seringue est placée sur une pompe d'injection (4) située à l'extérieur de la cage.

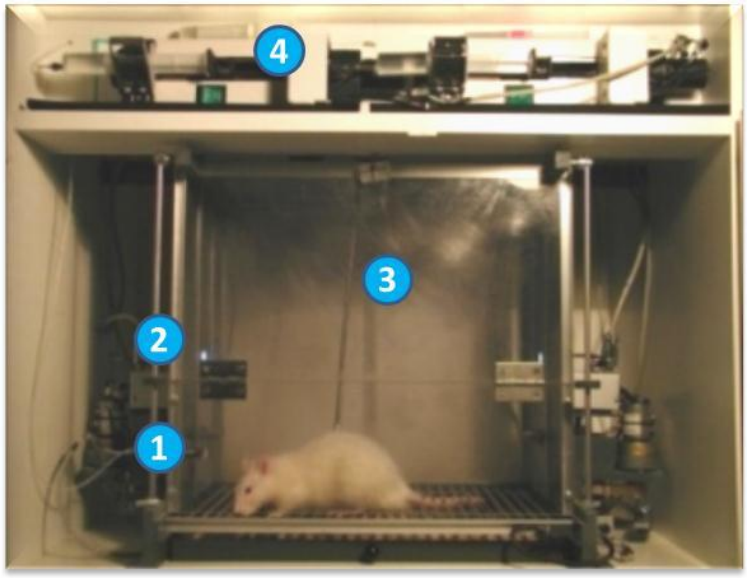


Figure 11 : Dispositif expérimental utilisé pour l'auto-administration intraveineuse de nicotine.

III.A.1.b Principe expérimental

Le principe consiste à permettre à l'animal de s'injecter volontairement par voie intraveineuse une dose fixe de nicotine. L'introduction du museau du rat dans l'un des trous, défini comme « actif » entraine l'injection d'une dose de nicotine (30µg base/kg/infusion, ou 30 puis 60µg base/kg/infusion selon l'expérience). Les visites dans l'autre trou, défini comme « inactif » sont sans conséquence. Chaque injection (0.1 mL en 3 secondes) est signalée par un stimulus lumineux d'une durée de 3 secondes situé au-dessus du trou « actif ». L'association de l'action rapide de la drogue et du stimulus facilite l'apprentissage du comportement d'auto-administration. Chaque injection est suivie d'une période réfractaire de 20 secondes durant laquelle les visites du trou actif sont comptabilisées mais n'entrainent pas d'injection supplémentaire. Le nombre de visites dans chaque trou, ainsi que le nombre d'injections sont comptabilisés par un système d'enregistrement couplé à un ordinateur.

III.A.1.c Mesure de la motivation persistante pour la drogue

Un mois après l'arrêt des sessions quotidiennes d'auto-administration, les animaux sont à nouveau placés dans les cages d'auto-administration en situation d'extinction. La motivation persistante pour la nicotine est quantifiée par la répétition du comportement de visite du trou actif malgré l'absence de drogue délivrée. La rechute peut être induite par plusieurs facteurs

précipitants, tels que les effets incitateurs de la drogue ou des stimuli précédemment associés à la prise de drogue.

III.A.1.c.(i) Rechute induite par la drogue

Immédiatement avant le début du test, les animaux reçoivent une injection de nicotine (0.3mg/kg, sc) (LeSage et al., 2004; Clemens et al.). Ils sont ensuite placés dans les cages d'auto-administration et le nombre de visites dans chaque trou est comptabilisé. Le stimulus lumineux n'est jamais présenté au cours de cette session.

III.A.1.c.(ii) Rechute induite par présentation d'un stimulus lumineux

Les animaux sont replacés dans les cages d'auto-administration et le stimulus lumineux précédemment associé à l'infusion de nicotine est présenté en début de séance, puis pour chaque visite du trou « actif ». Le nombre de visites dans chaque trou est comptabilisé.

III.B. Exposition chronique à la nicotine par injections sous-cutanées

Pour préparer un groupe rat avec une intoxication à la nicotine équivalente à celle du groupe de rats à forte consommation volontaire de nicotine (moyenne du groupe ±SEM), nous avons procédé à une exposition chroniquedes rats par injections répétées de nicotine.
L'intoxication chronique à la nicotine est donc réalisée au moyen d'injections répétées, à raison de 2 injections quotidiennes à la dose de 1 mg base/kg/2 ml. La dose de nicotine administrées est calculée de telle sorte que les animaux reçoivent la quantité moyenne de nicotine consommée par les animaux ayant eu **la plus forte consommation de nicotine**. Au bout de 32 jours de traitement, les rats ont reçu 45mg de nicotine base/kg. Les animaux sont été sevrés par l'arrêt des injections de nicotine.

III.C. Auto-administration orale d'eau

III.C.1. Dispositif expérimental

L'expérience se déroule dans une salle et des cages opérantes différentes de celles utilisées pour l'auto-administration intraveineuse de nicotine. Les cages d'auto-administration (30cm x 40cm x 37 cm, *Imetronic, France*) sont pourvues d'un panneau opérant équipé de deux leviers rétractables et d'une cupule en son milieu. La cupule est directement reliée à une seringue contenant 20 ml d'eau placée sur une pompe d'injection située à l'extérieur de la cage.

III.C.2. Principe expérimental

Au cours de séances quotidiennes de 30 minutes, les rats sont placés dans les cages, l'appui sur le levier « actif » permet la délivrance d'un volume d'eau dans la cupule (0.1 ml) siganlé par un signal lumineux. L'appui sur le levier « inactif » est sans conséquence. Afin d'augmenter la motivation pour le renforçateur hydrique, les rats sont privés d'eau 21h par jour durant toute la durée de l'expérience d'auto-administration orale. Ils ont accès à l'eau durant les 30 minutes du test puis pendant 1h30 après l'expérience.

IV. Injections intracérébrales

IV.A. Implantation des canules-guide intracérébrales

Les animaux sont anesthésiés avec une solution mixte de xylazine et ketamine (cf III.A.1 Chirurgie implantation de cathéter) et placés dans l'appareil stéréotaxique (*Kopf Instruments*). Les animaux sont implantés bilatéralement avec des canules-guide de micro-injection (diamètre 0.06mm, longueur 10mm, acier inoxydable) dont les extrémités sont situées 2 mm au-dessus du site d'injection. Les coordonnées sont exprimées en fonction des coordonnées stéréotaxiques du Bregma d'après l'atlas de Paxinos et Watson (2007). Les canules-guide sont implantées : dans l'aire tegmentale ventrale (ATV, n=13, antéropostérieure (AP) = -5.6 mm, médiolatérale (ML) =±0.9 mm, dorsoventrale (DV) =−6.2 mm), dans le noyau accumbens (Nac, n=9; AP = +1.7 mm, ML =±1.7 mm, DV =−5 mm) ou dans le noyau du lit de la strie terminale (BNST, n=13, AP = -0.1mm, ML =±1.3 mm, DV =-4.8mm). Les canules-guide sont ancrées au crâne grâce à des vis et du ciment dentaire. A la fin de la chirurgie, des stylets sont insérés dans les canules-guide pour les obstruer et protéger le cerveau de toute contamination externe. Les animaux sont remis en expérience après cinq jours de repos post-opératoire.

IV.B. Procédure expérimentale

Il est à noter que les animaux sont testés une fois par semaine pour permettre un retour à la ligne de base d'AAIV avant chaque nouveau test. Par ailleurs, le premier test post-implantation consiste à manipuler les stylets pour habituer les animaux au mode opératoire suivi pour les tests ultérieurs. Ensuite pour chaque test, les stylets sont retirés et les canules nettoyées pour préparer la descente des aiguilles d'injection. Immédiatement après, le rat est injecté pendant 1min 57sec avec l'AM 251 (0.5 µl/site). A la fin de l'injection, les aiguilles

sont laissées en place pendant 2min pour permettre au produit de diffuser dans les tissus. Les stylets propres sont replacés dans les canules et le rat est transféré dans la cage opérante pour le test.

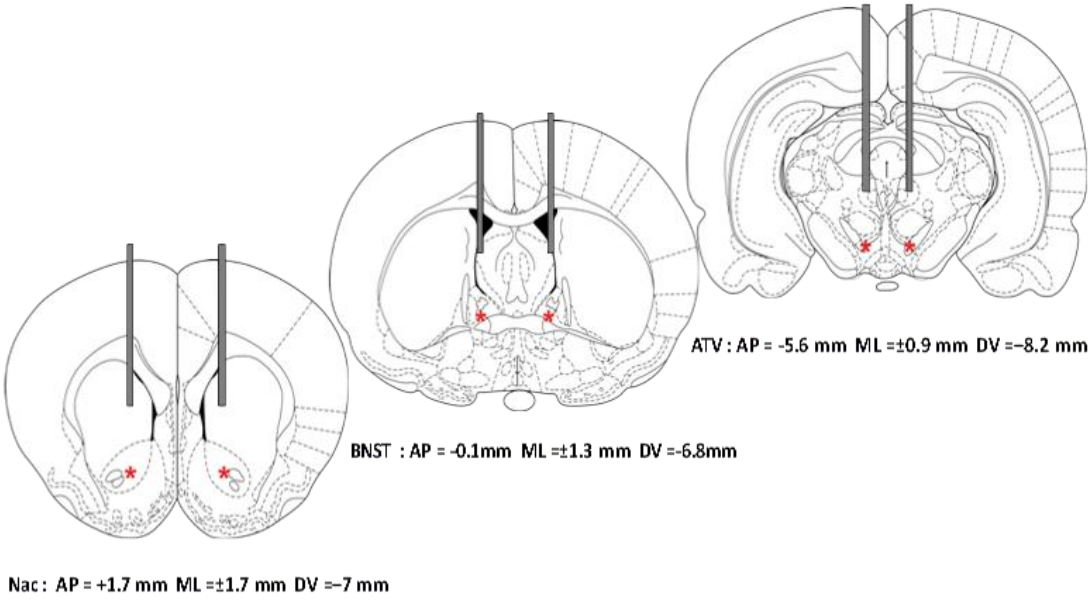


Figure 12 : Sites d'injections intra-cérébrales de l'AM251

pour le Nac (n=9), le BNST (n=13) et l'ATV (n=13)

Le site d'injection (en rouge) est situé 2 mm sous la canule (en gris).

V. Mesures comportementales de l'anxiété

V.A. <u>Test du labyrinthe en croix surélevé (Elevated Plus Maze, EPM)</u>

Le test du labyrinthe en croix surélevé est utilisé pour mesurer l'anxiété de base des animaux. Il est fondé sur le conflit entre l'aversion des rongeurs pour les espaces ouverts et le désir d'explorer un nouvel environnement. Le dispositif situé à 60 cm du sol est constitué d'un labyrinthe à quatre bras : deux ouverts (sans parois) et deux fermés (parois de 30 cm) (Figure 13). Ce test est réalisé sur une session unique de 5 min, enregistrée par un système vidéo. Au début de la séance test, le rat est placé au centre du labyrinthe tête face au bras ouvert, puis il est libre d'explorer les différents bras. A posteriori, la visualisation des bandes vidéo permet de quantifier différentes variables telles que le nombre d'entrées et le temps

passé dans les bras ouverts et les bras fermés ainsi que le temps passé au centre. Plus un animal est anxieux, moins il entre et reste dans les bras ouverts.

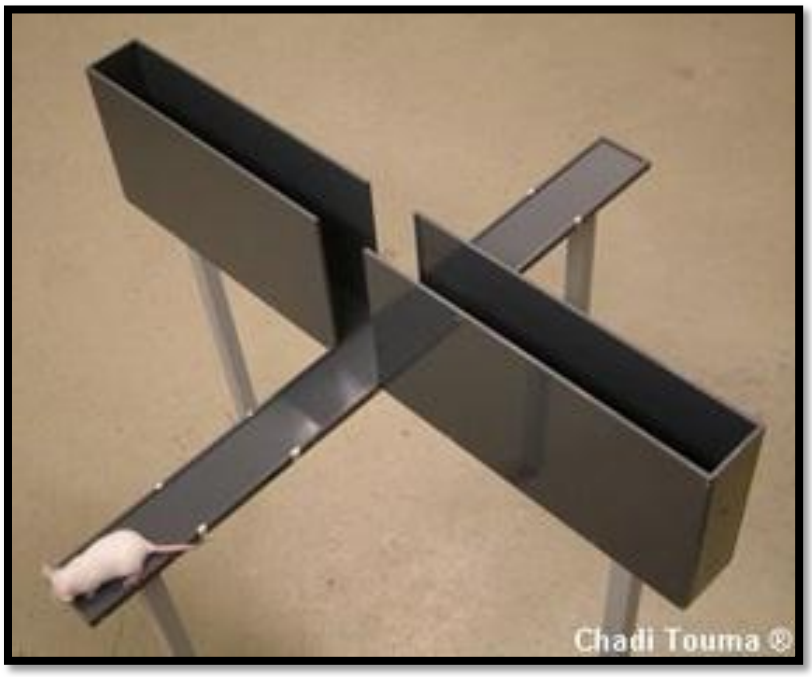


Figure 13 : dispositif pour le test du labyrinthe en croix surélevé.

V.B. Test d'hypophagie induite par la nouveauté (Novelty supressed feeding, NSF)

Le test d'hypohagie est utilisé pour évaluer l'état d'anxiété après un stress modéré, lequel ici est une privation de nourriture pendant 24h avant le début du test. Ce test induit une situation conflictuelle entre la motivation dirigée vers la nourriture et la peur de s'aventurer au centre d'une enceinte ouverte, éclairée et inconnue. Le dispositif consiste en une enceinte de forme carrée (100 x 100 x 30 cm) au centre de laquelle est placée une quantité donnée de nourriture (45g) qui est la même nourriture que celle donnée en zone de stabulation . Vingt-quatre heures avant le test, les animaux sont privés de nourriture. Au moment du test qui est réalisé sur une session unique de 10 min, le rat est placé dans un coin du dispositif. La latence pour aller au centre, la latence pour commencer à manger, le nombre d'entrées dans la zone centrale ainsi que le temps passé dans les espaces autour de la zone centrale (Figure 14) sont alors comptabilisés grâce à un système vidéo couplé à un logiciel de vidéo tracking (*View Point , France*). Plus l'animal est anxieux, plus il met de temps pour aller au centre de l'arène et plus il tarde pour commencer à manger. Afin de déterminer l'effet de la privation

alimentaire sur les rats, les animaux sont pesés 24 heures avant le test, immédiatement avant le test et 24 heures après le test.

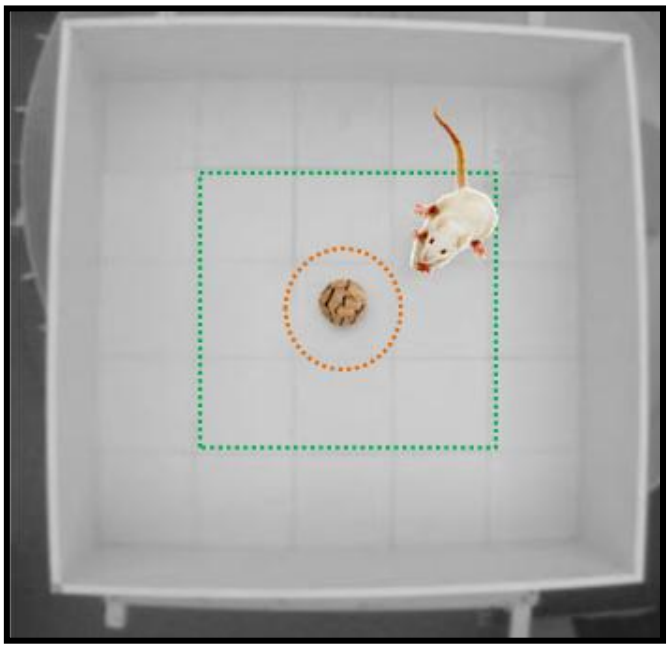


Figure 14 : **Test d'hypophagie induite par la nouveauté**. La nourriture est disposée au centre de l'arène. Le cercle orange definit la zone centrale et le carré vert l'espace autour de cette zone.

V.C. Test d'interaction sociale

Les rats sont des animaux sociaux, cependant, le comportement social peut être diminué lorsque les conditions environnementales sont stressantes. Ainsi le comportement d'évitement social est utilisé pour caractériser l'état d'anxiété (File and Hyde, 1978). Ce test consiste à laisser un sujet explorer librement un congénère non familier dans un environnement neutre. Le test se déroule dans une arène (de 50 x 50 x 40 cm) faiblement éclairée. Deux rats de poids similaire et de même histoire pharmacologique mais de cages de stabulation différentes sont placés 10 min dans l'arène (McGregor et al., 2003). L'exploration sociale est mesurée par le temps passé par le sujet autour de son congénère et par la durée et le nombre de comportements d'interaction sociale tels que le reniflement, le suivi du congénère, l'exploration anogénitale, l'évitement et le toilettage. Une caméra vidéo placée au-dessus de l'arène et couplée à un ordinateur permet l'enregistrement. La quantification des des interactions est faite à posteriori. Plus l'animal est anxieux, plus il évite le congénère.

VI. Mesure de l'état dépressif

VI.A. Test de la nage forcée (Test de Posolt)

Le test de la nage forcée permet de quantifier le comportement de résignation, qui est un comportement que l'on assimile à un état de type dépressif chez le rat (Porsolt et al., 1977). Ce test est également utilisé pour valider les effets antidépresseurs d'une molécule. Le dispositif expérimental est constitué d'un cylindre en plexiglas transparent de 51 cm de hauteur, 19 cm de diamètre contenant une hauteur d'eau de 29 cm à une température de 23±1°C (Figure 15) dans lequel le rat doit se maintenir à la surface. Le protocole du test de Porsolt présente une session d'entrainement de 15 min la veille du test, et le lendemain, une session test de 5 min. La séance d'entrainement permet aux rats d'explorer l'environnement et de comprendre qu'il n'y a pas d'issue possible que de flotter ou de nager. Lors de la séance test l'animal est placé 5 min dans le dispositif expérimental les trois paramètres suivants sont mesurés : l'immobilité, l'ascension contre la paroi et la nage. Plus un animal présente un comportement résigné, plus ses mouvements sont de petite amplitude pour flotter et rester immobile. Le test est enregistré par caméra vidéo et à posteriori, nous avons quantifié le temps d'immobilité pour chaque sujet.

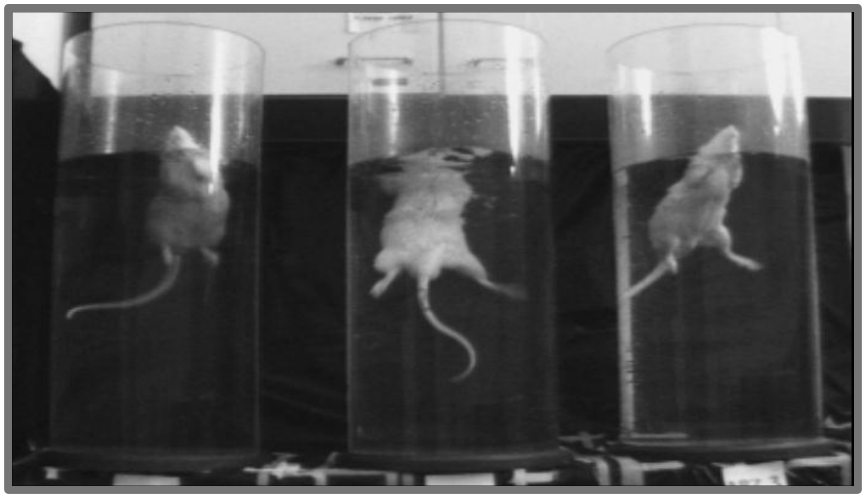


Figure 15 : Dispositif pour le test de la nage forcée.

L'animal est placé dans un cylindre rempli d'eau à 23°C et le temps d'immobilité comptabilisé au cours des 5 min de la séance test.

VI.B. La préférence pour le sucrose

Le test de préférence pour le sucrose, permet de quantifier l'état d'anhédonie, c'est-à-dire l'absence de ressenti du plaisir à partir d'une récompense naturelle palatable (dans notre cas expérimental : le sucrose) (Papp et al., 1991).

L'anhédonie avec l'humeur dépressive, est un des symptômse principal et récurrent de la dépression chez l'homme (Auriacombe et al., 1997).

Ce test de préférence de sucrose peut être répété plusieurs fois. Pour chaque séance test, le mode opératoire est le suivant : avant de procéder aux séances tests, les rats sont d'abord exposés à la solution de sucrose pendant 48h. Le jour du test, chaque rat est placé en cage individuelle et privé en eau et nourriture pendant quatre heures. Les animaux ont ensuite accès à 2 bouteilles, une bouteille de sucrose 5% et une bouteille d'eau pendant une heure. A la fin de la séance, la consommation des liquides est quantifiée par comparaison du poids des bouteilles avant et après l'heure de test, et exprimée en fonction du poids des animaux (ml/kg). Nous exprimons également pour chaque rat un indice de préférence pour le sucrose : Indice de préférence= (total sucrose/ (total sucrose + total eau)) x 100. Un indice de préférence faible traduit un état d'anhédonie.

VII. Activité locomotrice

VII.A. Les cages d'activité

Les rats montrent une activité générale biphasique, avec une phase d'hypoactivité le jour et d'hyperactivité la nuit. Pour mettre en évidence d'éventuelles perturbations de ce rythme circadien, les animaux sont placés en cages d'activité et leur comportement locomoteur est enregistré durant 24 heures à des temps clé de l'expérience : i) avant toute exposition à la nicotine, ii) après un jour de sevrage nicotinique et iii) après 46 jours de traitement à l'URB597. Les cages d'activité (41x26x28 cm) sont constituées d'une porte, d'un plancher grillagé et de parois en plexiglas transparent (*Imetronic, France*). Elles sont équipées de deux rampes de cellules photoélectriques sur chaque paroi, ces rampes sont situées à 2.6 cm du sol. Chaque coupure du faisceau infrarouge est enregistrée et le nombre de coupures enregistrées par unité de temps est considéré comme un indice de l'activité locomotrice générale de l'animal. Les paramètres mesurés sont les va et vient et l'activité à l'avant + l'activité à l'arrière de la cage.



Figure 16 : cage d'activité

VII.B. Test du tapis roulant ou « Treadmill »

La résistance à l'effort des animaux est mesurée grâce au test du tapis roulant. Le dispositif est composé d'un tapis roulant (45x100mm) à vitesse ajustable et à son bout, d'une grille électrifiée (190x100) à intensité de choc également ajustable (*LE 8700, Panlab*) (Figure 17). L'animal est contraint à courir sur le tapis roulant (1) afin d'éviter les chocs éclectiques délivrés par la grille électrifiée (2). Le test est composé de 2 phases : une phase d'entrainement et une séance test. Vingt-quatre heures avant le test les rats sont soumis à la séance d'entrainement de 15 min (vitesse de 30cm/sec et intensité de 0.4mA) pour apprendre que seule l'option de la course leur permet d'éviter les chocs électriques. Lors de la séance test, l'animal est placé 5 min dans le dispositif expérimental (vitesse 50cm/sec et intensité 0.4mA). La résistance à l'effort est quantifiée par la mesure de la distance parcourue, le nombre de chocs reçus et la durée totale des chocs. Plus l'animal est résistant, moins il reçoit de chocs.



Figure 17 : Tapis roulant électrifié pour le test de résistance à l'effort

VIII. Marqueurs biologiques

VIII.A. Dosage des taux sanguins de corticostérone

VIII.A.1. Prélèvements sanguins

Les taux sanguins de corticostérone révèlent l'activité de l'axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien mobilisé lors d'un stress. Le prélèvement sanguin pour doser la corticostérone est la dernière manipulation réalisée dans l'étude longitudinale menée chez les rats abstinents de la nicotine (cf. Résultats, partie 2) car c'est un stress intense pour les rats (Chaouloff et al., 1989) qui pourrait interférer avec le bon déroulement des autres tests comportementaux.

Pour se placer dans les meilleures conditions et observer une nette augmentation des niveaux de corticostérone suite au stress, le test a lieu au début de la phase diurne, période où la corticostérone circulante est la plus basse. Le point à t0 reflète le niveau de base, il est suivi d'un stress de contention de 30 min durant lequel les animaux sont placés dans des tubes de contention de 10 cm de diamètre. Le prélèvement à t30 min, correspond au pic d'activité de l'axe HPA. Les animaux sont ensuite replacés dans une salle de stabulation et sont sortis pour effectuer des prélèvements à t60 puis t120 afin de mesurer la cinétique de retour à l'état basal. Les échantillons sont collectés dans des ependorffs contenant 5µl d'héparine, afin d'éviter la

coagulation du sang, et stockés dans de la glace. Les échantillons sont ensuite centrifugés 15 min à 4000rpm et le plasma contenant la corticostérone est extrait et stocké dans un congélateur à-80°C.

VIII.A.2. Dosage radio immunologique de la corticostérone plasmatique

Le dosage de corticostérone plasmatique a été réalisé en collaboration avec le Dr Marie-Pierre Moisan (NutriNeuro, INRA UMR1286). Le dosage est basé sur la compétition de 2 substances, la corticostérone froide (B) et la corticostérone marquée au 3H (B*), pour un ligand spécifique, l'anticorps anti-corticostérone (AC). Les quantités d'AC et de B* fixées permettent de déduire la quantité de B présente dans l'échantillon. Après équilibre des échanges, la fraction libre est absorbée sur du charbon et la fraction liée est dosée par mesure de la radioactivité. La quantité d'anticorps étant constante, la fixation de l'hormone radioactive sera inversement proportionnelle à la concentration de corticostérone présente dans l'échantillon à analyser.

IX. Analyses statistiques

Pour les expériences d'AAIV, les analyses statistiques sont réalisées à partir d'une analyse de variance paramétrique (ANOVA), suivie d'un test post-hoc (PLSD de Fisher) quand nécessaire. Les comparaisons entre deux groupes sont analysées par le test de Student (ou t test).

Dans la partie I : l'effet du traitement aigu avec l'AM251 est évalué par une ANOVA à deux facteurs dépendants : un facteur doses d'AM251 (3 niveaux pour les injections ic : AM0, AM1 et AM10) et un facteur : réponses (2 niveaux : réponses renforcées (RR) et non renforcés (NR)) ou un facteur dépendant « injections ». L'analyse de l'effet de l'AM251 iv (AM0 vs. AM2) sur la consommation de nicotine est réalisée grâce au test de Student.

Dans la partie II : l'analyse des résultats de l'AAIV est réalisée avec une ANOVA à mesures répétées avec 2 facteurs dépendants : les jours et les réponses (2 niveaux,RR et NR) et un facteur indépendant : AAIV (groupe saline et nicotine). L'analyse du pourcentage de discrimination est également réalisée grâce à une ANOVA à mesures répétées avec un facteur dépendant « jours » et un facteur indépendant « AAIV » (2 niveaux : saline et nicotine).

Pour les tests quantifiant l'état d'anxiété et l'état dépressif, les résultats des groupes « saline » et « nicotine » sont analysés séparément. Les résultats des groupes « saline » sont comparés par un test de Student. Pour les groupes « nicotine» les résultats sont analysés à partir d'une ANOVA à deux facteurs indépendants : nicotine (2 niveaux : Nicotine – et Nicotine+) et URB (2 niveaux : URB et solvant), et des facteurs dépendants, suivis lorsque c'est nécessaire, par le test *post-hoc* PLSD de Fisher.

Dans l'expérience où les animaux ont été exposés à la nicotine par injections répétées : i) les résultats du test d'EPM sont analysés par une ANOVA à deux facteurs dépendants : le facteur URB (2 niveaux : Solvant et URB) et le facteur AM251 (2 niveaux : AM251 et Véhicule).

ii) les résultats du test de résistance à l'effort sont analysés par une ANOVA à un facteur indépendant « groupes ».

Tous les résultats présentés sont exprimés par la moyenne du groupe (± SEM).

Pour tous les tests statistiques réalisés, les valeurs sont considérées comme significatives pour $p<0.05$.

PARTIE 1 : Identification des structures cérébrales impliquées dans la diminution des propriétés renforçantes de la nicotine par les antagonistes CB1

I. Introduction

Le SEC joue un rôle central dans le contrôle des effets renforçants et motivationnels des drogues. De nombreuses études suggèrent que le récepteur CB1 est une cible pharmacologique potentielle pour le traitement thérapeutique de la dépendance à la nicotine, la substance incriminée dans les propriétés toxicomanogènes du tabac [pour une revue détaillée cf. Introduction partie II.C. 1, et (Maldonado and Berrendero, 2010)].Si les effets de l'injection périphérique de l'antagoniste des récepteurs CB1 sur les propriétés addictives de la nicotine sont bien connus, les substrats neurobiologiques qui sous-tendent le contrôle des propriétés renforçantes de la nicotine par les CB1 restent paradoxalement peu étudiés. La nicotine, comme les drogues d'abus, usurpe le système de récompense. Comment comprendre les effets, sur la prise volontaire de nicotine, de l'injection locale d'un antagoniste des récepteurs CB1 dans les structures clés de ce circuit ? L'administration systémique de nicotine entraine une augmentation de l'activité des neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale (ATV) (Mansvelder et al., 2002) et la libération de dopamine dans le noyau accumbens (Nac)(Pontieri et al., 1996). Plus spécifiquement, la libération soutenue de DA qui sous-tend les effets renforçants de la nicotine s'explique, par une action directe de la nicotine sur les récepteurs nACh des corps cellulaires des neurones DA, et par une action indirecte sur les afférences glutamatergiques et GABAergiques (cf. introduction partie II.A.5). Des études suggèrent que les eCB interagissent avec le système DA mésolimbique (Lupica and Riegel, 2005) afin de moduler les propriétés addictives de la nicotine. Ainsi, le blocage pharmacologique systémique des récepteurs CB1 prévient la libération de dopamine induite par la nicotine dans le Nac (Cohen et al., 2002; Cheer et al., 2007).

Au niveau de l'ATV, les récepteurs CB1 sont présents sur les afférences excitatrices glutamatergiques et les interneurones inhibiteurs GABAergiques qui modulent l'activité de la voie dopaminergique mésolimbique (Szabo et al., 2002; Melis et al., 2004; Riegel and Lupica, 2004). Les récepteurs CB1 sont également présents dans le Nac (Herkenham et al., 1991). Mais bien que la voie principale de ce système de récompense soit constituée d'un faisceau de neurones DA reliant l'ATV et le Nac, l'activité de cette voie peut être modulée au niveau de l'ATV par les afférences glutaminergiques provenant d'autres structures et notamment du noyau du lit de la strie terminale (BNST), un des principaux relais de l'excitation corticale (Massi et al., 2008). Les projections glutamatergiques excitatrices du

BNST exercent une forte influence sur les propriétés de décharge des neurones DA de l'ATV (Georges and Aston-Jones, 2001, 2002; Caille et al., 2009). Ces projections excitatrices sont impliquées dans l'auto-administration de cocaïne et de nourriture (Dumont et al., 2005; Grueter et al., 2006), la recherche de drogue (Aston-Jones and Harris, 2004) et la rechute pour la cocaïne induite par un stress (Erb et al., 2001). Par ailleurs, on trouve dans le BNST, des récepteurs CB1 fonctionnels (Puente et al., 2010) qui jouent un rôle central dans la modulation de l'excitation exercée sur les neurones DA mésolimbique (Massi et al., 2008). La présence des récepteurs CB1 dans l'ATV, le Nac et le BNST (Cohen et al., 2005a; Maldonado et al., 2006; Puente et al.), ainsi que le rôle central que jouent ces structures dans le processus de l'addiction à la nicotine, posent la question de l'implication des récepteurs CB1 de ces structures dans le contrôle des propriétés renforçantes de la nicotine.

Notre hypothèse est que la nicotine déclenche une transmission endocannabinoïde rétrograde qui régule la balance entre les neurotransmetteurs GABA et glutamate, responsables des effets renforçants de la nicotine. Le blocage des récepteurs CB1, en altérant cette régulation, pourrait réduire les propriétés renforçantes de la nicotine et par conséquent diminuer la prise de nicotine.

Le but de cette étude est de réaliser une administration locale d'un antagoniste des récepteurs CB1: l'AM251 dans l'ATV, le Nac et le BNST afin de tester l'implication de ces trois structures dans la modulation par le SEC des propriétés renforçantes de la nicotine.

II. Matériels et Méthodes

II.A. Protocole expérimental

Le protocole expérimental est décrit dans la figure 18. Dans cette étude, 35 rats ont été entrainés au comportement d'auto-administration intraveineuse de nicotine (30 µg/kg/0.1 ml) au cours de séances journalières de 2 heures.

Les animaux ont d'abord réalisé la phase d'acquisition pendant laquelle ils passent progressivement d'un protocole de renforcement à ratio fixe 1 (FR1, une visite du trou actif pour une injection) à un ratio fixe 5 (FR5, 5 visites du trou actif pour une injection). Lorsque le comportement d'AAIV est stable et robuste (25 séances environ), les rats sont implantés avec des canules-guide intracérébrales bilatérales ciblant : l'aire tegmentale ventrale (ATV, n=13), le noyau accumbens (Nac, n=9) ou le noyau du lit de la strie terminale (BNST, n=13). Les animaux sont ensuite remis en AAIV, et lorsque leur consommation quotidienne est à nouveau stabilisée, nous effectuons les tests avec les différentes doses d'AM251 : 0, 1 et 10µg/0.5µl/côté, i.c. (AM0, AM1 et AM10). Tous les rats sont testés avec toutes les doses d'AM251, dans un ordre aléatoire.

A la fin de l'expérience, pour chaque lot de rats, nous avons également testé l'effet d'une injection périphérique d'AM251 (0 et 2mg/kg/ml, i.v, AM0 et AM2) sur la consommation de nicotine. Sur l'ensemble, 22 rats ont pu être testés, le reste n'a pu l'être pour des raisons de cathéter percé ou bloqué.

De plus, pour contrôler la spécificité de l'effet observé au cours de l'expérience ciblant l'ATV, nous avons également examiné l'effet de l'AM251 (0 et 10µg/0.5µl/côté) injecté intra-ATV sur la consommation d'un renforçateur hydrique (l'eau), chez des animaux motivés (21 h de privation hydrique). Sur les 13 rats de départ, seuls 8 rats ont été testés, les autres ne pouvant l'être pour cause de canules bouchées ou perdues.

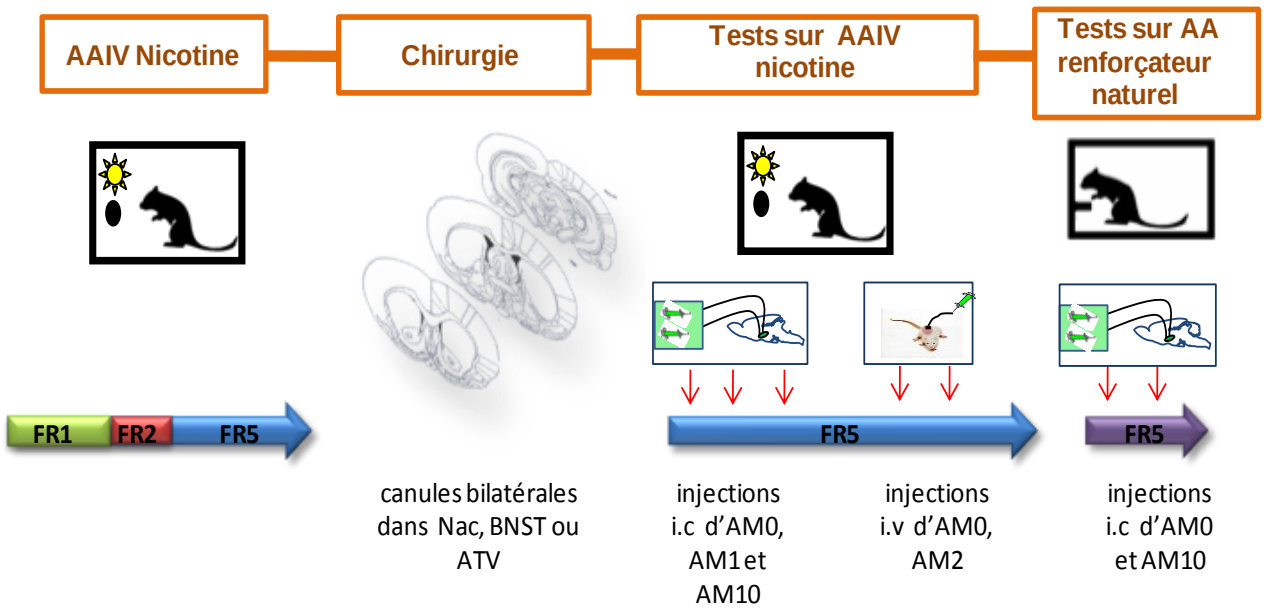


Figure 18 : protocole expérimentale

Après acquisition d'un comportement d'AAIV de nicotine stable, des canules-guides sont implantés dans le Nac, le BNST ou l'ATV. Une fois le comportement d'AAIV de nouveau stabilisé, nous avons testé l'effet d'injections locales dans les structures d'intérêt puis systémique d'AM251 sur la prise de nicotine. Enfin, l'effet de l'injection intra-ATV a été testé sur la motivation pour un renforçateur naturel dans un nouveau contexte opérant

II.B. Analyses Statistiques

L'effet du traitement aigu avec l'AM251 est analysé par une ANOVA à deux facteurs dépendants : un facteur « AM251 » (2 niveaux pour les injections iv : AM0 et AM2 et 3 niveaux pour les injections ic : AM0, AM1 et AM10) et un facteur « réponses » (2 niveaux : Réponses Renforcées et Non Renforcées) ou un facteur « injections ». L'analyse de l'effet de l'administration intraveineuse d'AM251 sur la consommation de nicotine est réalisée par le test de Student. Les résultats sont significatifs lorsque $p<0.05$.

III. Résultats

III.A. Effet d'une injection systémique d'un antagoniste CB1 sur la prise de nicotine

La littérature rapporte que l'injection périphérique d'un antagoniste CB1 suffit à réduire l'AAIV de nicotine, nous avons donc vérifié l'efficacité de l'injection intraveineuse de l'AM251 dans nos conditions expérimentales. Dans cette expérience, l'administration périphérique d'AM251 à 2mg/kg i.v. réduit significativement le nombre d'injections de nicotine (figure 19.a) [t test $t(22)=6.8$, $p<0.0001$]. En effet, l'administration d'AM251 entraine une diminution de 47.6 % ± 10.8 de la prise de nicotine (moyenne AM2 : 5.3 ± 0.6 injections) par rapport à l'administration du solvant (moyenne AM0 : 13 ± 1.2 injections). L'analyse globale du nombre de réponses lors des sessions tests indique que le traitement intraveineux à l'AM251 diminue le nombre de réponses totales [interaction AM251 x réponses : $F(1, 21) = 15.99$, $p<0.001$)]. Par ailleurs, l'analyse séparée du nombre de réponses renforcées (RR) et non renforcées (NR) révèle que l'injection périphérique de l'AM251 entraîne une diminution de la visite du trou actif (RR AM0 :82 ± 9.8 vs RR AM2 : 30 ± 3.5)(figure 19.b) [$t(22)=6.2$, $p<0.0001$] et du trou inactif (NR AM0 : 30.3 ± 4.5 vs NR AM2 : 15 ± 3.5) [$t(22) =4.2$, $p<0.0001$].

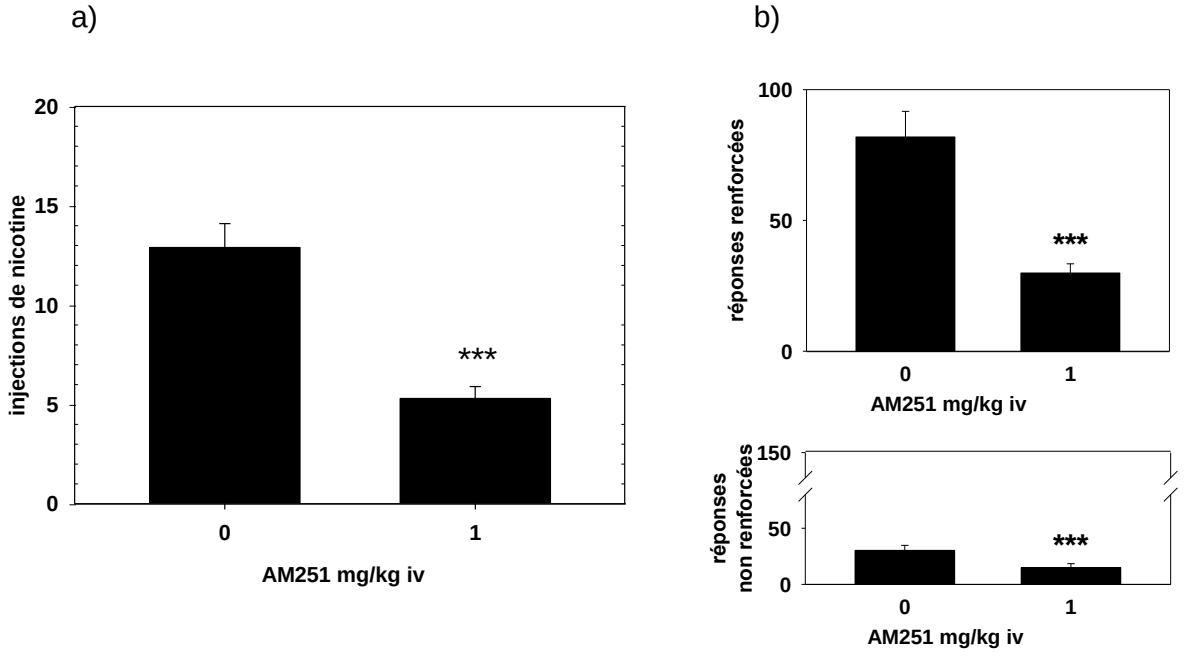


Figure 19 : Effet de l'injection périphérique de l'AM251 sur la prise volontaire de

nicotine sur a) le nombre total d'injections et b) le nombre de réponses renforcées et non renforcées aux cours de séances tests de deux heures (n=22). Les données sont collectées immédiatement après l'injection intraveineuse de l'AM251 aux doses de 0 (AM0) ou 2 (AM2) mg/kg/ml. Les résultats sont exprimés en moyenne± s.e.m. ***p<0.001, **p<0.01 par rapport au solvant (AM0).

III.B. Identifications des structures spécifiquement impliquées dans les effets des antagonistes CB1 sur la consommation de nicotine

III.B.1. Aire tegmentale ventrale

Le traitement avec l'AM251 diminue de façon significative le nombre d'injections de nicotine consommées au cours des séances tests [F (2, 24) =4.088; p<0.05] (Figure 20 a). Cet effet est dépendant de la dose d'AM251 administrée, le nombre moyen d'injection après administration du solvant (AM0 : 16 ± 2.3 injections) diminue de 7.5% ± 17.5 pour la dose d'AM251 de 1µg (AM1 : 13.6 ± 2.1 injections) et de 31.3% ± 10.6 pour la dose de 10µg (AM10 : 9.9 ± 1.5 injections). L'analyse post hoc révèle un effet significatif de la plus forte dose [PLSD de Fisher : AM0 vs. AM10, p<0.01]. L'analyse globale du nombre de réponses renforcées et non renforcées au cours des sessions tests montre un effet AM251 [F (2, 24) =3.26, p<0.05] et un effet réponses [F (1, 12) = 18.52, p<0.001]. Par ailleurs, l'analyse séparée du nombre de réponses renforcées (figure 20.b) et non renforcées(figure 20.c) révèle que l'injection bilatérale d'AM251 dans l'ATV diminue spécifiquement le nombre de visites du trou actif (RR AM0 : 100.7 ± 16.9 , RR AM1 : 80.3 ± 13.4, AM10 : 57.3 ± 11.3) [F (2, 24) =4.46, p<0.05, PLSD de Fisher: AM0 vs AM10 p<0.01] mais ne modifie pas le nombre de visites du trou inactif (NR AM0 : 51.5± 20, NR AM1 : 35.8 ±8.7, NR AM10 : 24.1± 8.5) [F (2, 24) = 1.33 NS].

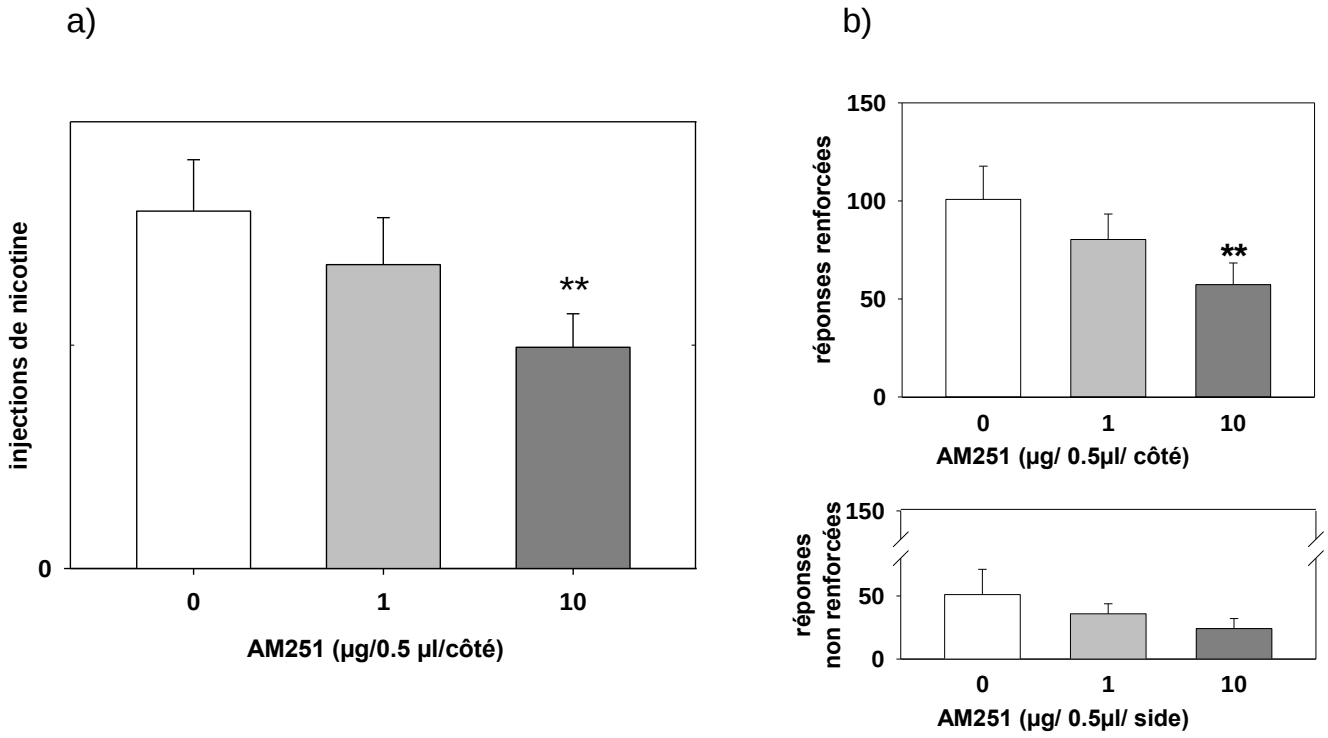


Figure 20 : Effet de l'injection intra-ATV de l'AM251 sur l'auto-administration de nicotine.

a) nombre d'injections et b) nombre de réponses renforcées et non renforcées au cours des séances tests de 2 heures. Chaque histogramme représente la moyenne ± s.e.m.

** $p<0.01$ par rapport à AM0.

III.B.2. Noyau Accumbens

L'injection d'AM251 dans le Nac ne modifie ni le nombre d'injections de nicotine consommées par les rats (AM0 : 13.7 ±1.5, AM1 : 12 ± 2.2, AM10 : 13 ±2.6 injections) [effet AM251 : F (2, 16)=0.166, p N.S] ni le nombre total de réponses [effet AM251 : F(2,16)=0.423, p N.S] au cours des séances tests [interaction réponses x AM251 : F(2,16)=1.1, p N.S] (RR AM0 : 81.3 ± 10, RR AM1 : 63.11 ± 13.3, RR AM10. : 73.7 ±17.9 et NR AM0 : 21.3 ± 5.5, NR AM1 : 17.7 ± 5, NR AM10 : 36.5 ± 15.2). (Figure 21)

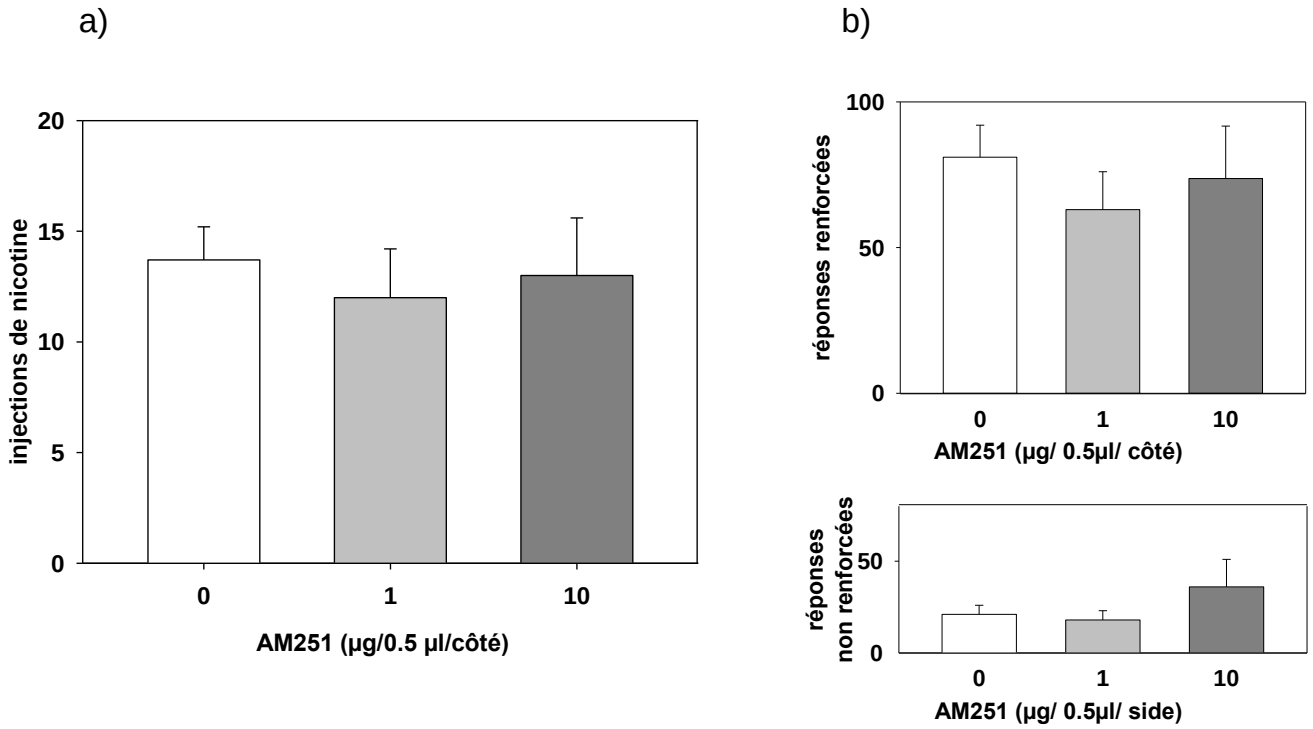


Figure 21 : Effet de l'injection intra-Nac de l'AM251 sur l'auto-administration de nicotine.

a) nombre d'injections et b) nombre de réponses renforcées et non renforcées au cours des séances tests de 2 heures. Chaque histogramme représente la moyenne ± s.e.m.

III.B.3. Noyau du lit de la strie terminale

L'injection intra-BNST de l'AM251 n'a pas d'effet significatif sur le nombre total d'injections de nicotine consommées au cours des séances tests (figure 22) (injections AM0 : 13.2 ±1.4, AM1 : 13.7 ± 2.1, AM10 : 13.4 ± 1.4) [effet AM251 : $F(2, 24)=0.022$, p N.S] et ne modifie pas le nombre de visites global (renforcées et non renforcées) durant les séances test [interaction AM251 x réponses : $F(2, 24)=0.83$, p N.S]. (RR AM0 : 69.4± 7.8, RR AM1 : 76.3 ±13.8, RR AM10. : 71.4 ± 8.6 et NR AM0 : 21.1 ± 5.5, NR AM1 : 11.8 ± 2.7, NR AM10 : 10.6 ± 2.7).

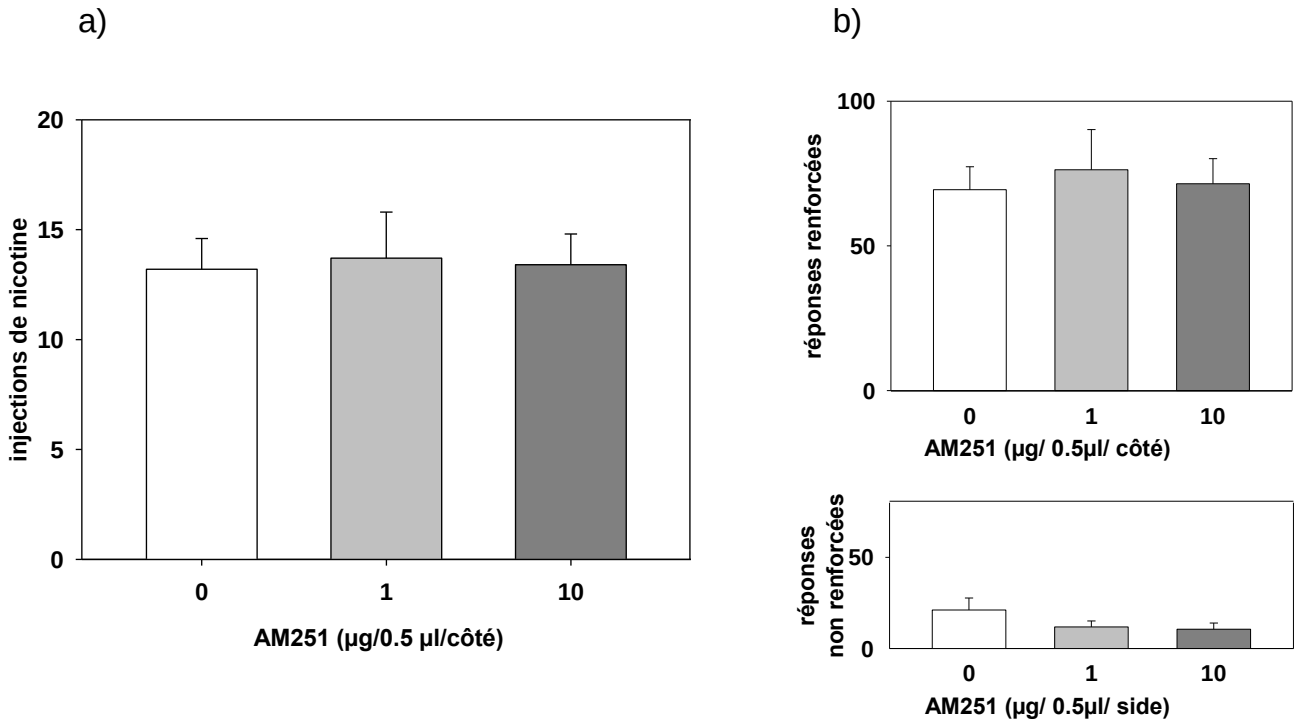


Figure 22 : Effet de l'injection intra-BNST de l'AM251 sur l'auto-administration de nicotine.

a) nombre d'injections et b) nombre de réponses renforcées et non renforcées au cours des séances tests de 2 heures. Chaque histogramme représente la moyenne ± s.e.m.

III.C. Spécificité de l'effet d'une injection intra-ATV de l'antagoniste CB1

Nous avons également mesuré l'effet d'injections intra-ATV sur un apprentissage opérant pour l'eau chez des animaux motivés (Figure 23). Les analyses statistiques indiquent que l'administration intra-ATV d'AM251 ne modifie pas le comportement d'auto-administration d'eau [interaction AM251 x réponses : $F(1, 7)=0.911$, p N.S] (RR AM0 : 72 ±13.3 , RR AM10 : 72 ± 16.5 et NR AM0 : 3.4 ± 1.1, NR AM10 : 1.1 ± 0.5) et l'AM251 ne diminue pas le nombre de distributions d'eau au cours de la séance test [t test $t(7)= 0.1312$ p=0.899 NS] (distribution AM0 : 69 ± 12.8 et AM10 : 67.2 ± 15.1).

Par ailleurs, l'injection intra-ATV ne modifie pas l'activité locomotrice [effet AM251 : $F (2, 24) =0.763$, p NS] au cours des séances tests (Figure 24).

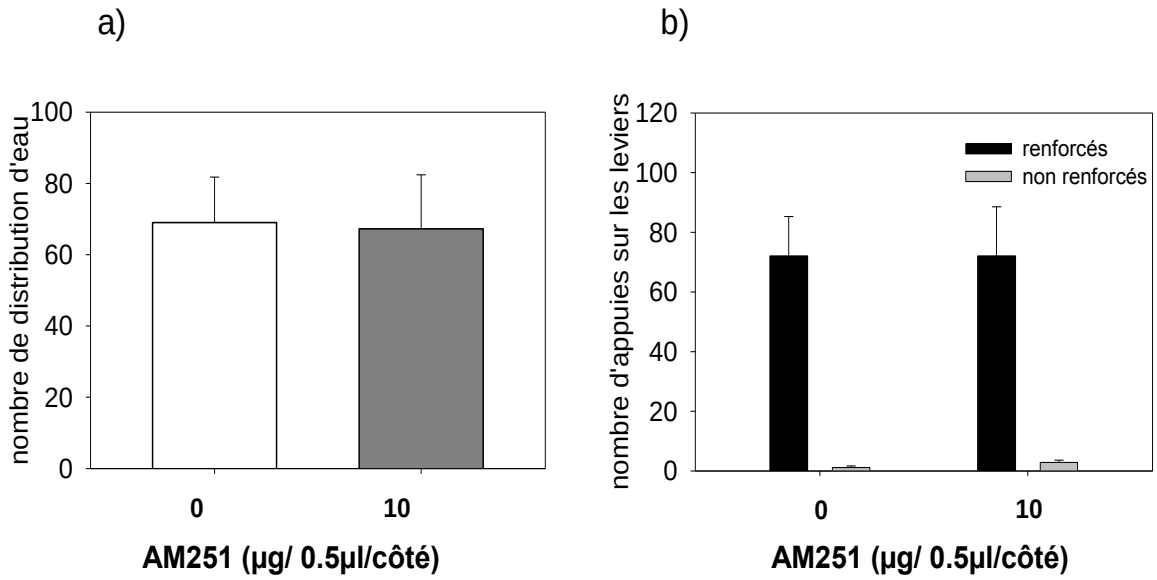


Figure 23 : Effet de l'injection d'AM251 intra-ATV sur un comportement opérant pour un renforçateur hydrique. a) Nombre de distributions d'eau et b) le nombre d'appuis sur le levier renforcé (en noir) et non renforcé (en gris) enregistrés au cours de séances de 30 minutes, après administration intra-ATV d'AM251 (0 et 10 µg/0.5µl/coté). Chaque histogramme représente la moyenne ± s.e.m.

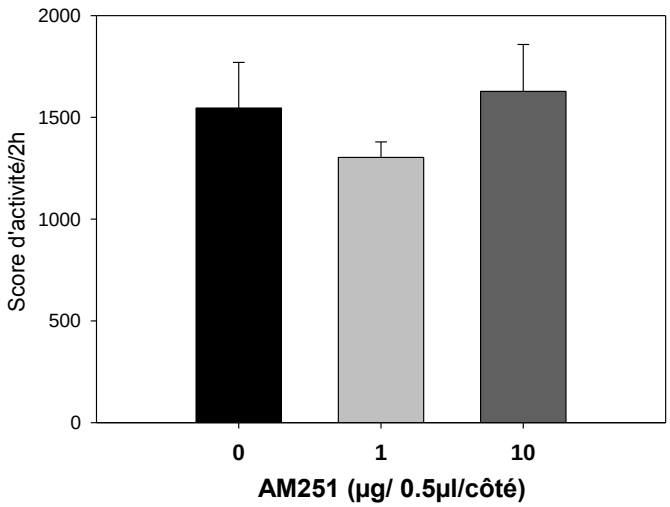


Figure 24 : Effet de l'injection intra-ATV d'AM251 sur l'activité locomotrice.

L'activité locomotrice est mesurée dans les cages d'auto-administration au cours des séances tests de deux heures. Chaque histogramme représente la moyenne ± s.e.m

IV. Conclusions et discussion

De nombreuses études ont mis en évidence le rôle des récepteurs CB1 dans le contrôle des propriétés renforçantes de la nicotine. Ce contrôle a pour effet de diminuer la consomation de nicotine ; les mechanismes et les structrures cérébrales impliquées restent à l'étude.

D'une part, nos résultats confirment que l'injection périphérique d'un antagoniste des récepteurs CB1 diminue de manière drastique la consommation de nicotine. D'autre part, parmi les trois structures testées : l'ATV, le Nac et le BNST, seul le blocage spécifique des récepteurs CB1 de l'ATV diminue de façon spécifique et dose dépendante la prise volontaire de nicotine. De plus, cet effet n'est pas conséquent à une diminution de la locomotion ou à une altération des processus d'apprentissage opérant car le blocage des récepteurs CB1 de l'ATV n'affecte ni l'activité générale, ni le comportement de prise volontaire d'eau chez des animaux motivés. Par ailleurs, les injections périphériques et intra-ATV d'AM251 diminuent la prise de nicotine de 47.6 % et 31.3% respectivement, suggérant que le blocage des récepteurs CB1 de l'ATV ne suffit pas à expliquer totalement l'inhibition du comportement de prise de nicotine. Ainsi, les récepteurs CB1 de l'ATV jouent un rôle crucial dans le contrôle des propriétés renforçantes de la nicotine, cependant notre étude démontre que d'autres structures et d'autres systèmes sont également essentiels.

L'ATV est une structure clé des effets renforçants de la nicotine. La balance entre les afférences excitatrices et inhibitrices au niveau de cette structure module les propriétés renforçantes de la nicotine. Lorsque cette balance est perturbée par l'administration d'un antagoniste nicotinique ou glutamatergique, on observe une diminution des propriétés renforçantes de la nicotine (Corrigall et al., 1994; D'Souza and Markou, 2011). Au niveau de l'ATV, les récepteurs CB1 sont présents sur les afférences excitatrices glutamatergiques, et de manière plus dense sur les interneurones inhibiteurs GABAergiques, qui ensemble, modulent l'activité de la voie dopaminergique mésolimbique (Szabo et al., 2002; Melis et al., 2004). Notre étude suggère donc que les antagonistes CB1, en bloquant l'action des eCB libérés suite à la stimulation par la nicotine sur les neurones GABA, contribueraient à rétablir la transmission GABA inhibitrice, et ainsi inhiber l'activité des neurones DA responsable des effets renforçants de la nicotine.

En revanche, l'inhibition des récepteurs CB1 du Nac et du BNST ne modifie pas les propriétés renforçantes de la nicotine. Le Nac reste cependant un site privilégié de la modulation des propriétés renforçantes de la nicotine par d'autres systèmes de

neurotransmission. Par exemple, l'administration intra-Nac d'un antagoniste des récepteurs mGlu5, diminue les effets renforçants de la nicotine (D'Souza and Markou, 2011), ce qui suggère que la transmission glutamatergique dans le Nac joue un rôle dans la modulation des effet renforçants de la nicotine, mais qu'elle n'implique pas les récepteurs CB1. Par la densité des afférences glutamatergiques qu'il envoie vers l'ATV (Georges and Aston-Jones, 2001, 2002) et la présence de récepteurs CB1 (Massi et al., 2008), le BNST semblait être une cible privilégiée pour le contrôle des propriétés renforçantes de la nicotine. En accord avec cette idée, dans une étude récente, nous avions montré le développement d'une hyper excitabilité de cette voie glutamatergique spécifiquement chez les animaux à prise volontaire de nicotine (Caille et al., 2009). Cependant, nos résultats démontrent que les récepteurs CB1 du BNST ne suffisent pas pour contrôler la prise de nicotine.

Article

Nicotine reinforcement is reduced by cannabinoid CB1 receptor blockade in the ventral tegmental area

NICOTINE REINFORCEMENT IS REDUCED BY CANNABINOID CB1 RECEPTOR BLOCKADE IN THE VENTRAL TEGMENTAL AREA

Amelie Simonnet, Martine Cador and Stephanie Caille

Université de Bordeaux, INCIA, F-33076 Bordeaux, France ; CNRS, UMR5287 INCIA, F-33076 Bordeaux, France

Corresponding author:
Stephanie Caille
University of Bordeaux, CNRS UMR5287, BP31
146 rue Leo Saignat, 33076 Bordeaux, France
Tel : 33-557-57-1563 ; fax : 33-556-90-0278
Email address : stephanie.garnier@u-bordeaux2.fr (Stephanie Caille)

ABSTRACT

Cannabinoid type 1 (CB1) receptors control the motivational properties and reinforcing effects of nicotine. Indeed, peripheral administration of a CB1 receptor antagonist dramatically decreases both nicotine taking and seeking. However, the neural substrates through which the cannabinoid CB1 receptors regulate the voluntary intake of nicotine remain to be elucidated. In the present study we sought to determine whether central injections of a CB1 receptor antagonist delivered either into the ventral tegmental area (VTA) or the nucleus accumbens (NAC) may alter nicotine intravenous self-administration (IVSA). Rats were first trained to self-administer nicotine (30 µg/kg/0.1 ml). The effect of central infusions of the CB1 antagonist AM 251 (0, 1 and 10 µg/0.5 µL/side) on nicotine-taking behavior was then tested. Intra-VTA infusions of AM 251 dose-dependently reduced IVSA with a significant decrease for the dose 10 µg/0.5 µl/side. Moreover, operant responding for water was unaltered by intra-VTA AM 251 at the same dose. Surprisingly, intra-NAC delivery of AM 251 did not alter nicotine behavior at all. These data suggest that in rats chronically exposed to nicotine IVSA, the cannabinoid CB1 receptors located in the VTA rather than in the NAC specifically reduce nicotine reinforcement and, subsequently, nicotine taking behavior.

Keywords AM 251, intravenous self-administration, nicotine, nucleus accumbens, rat, ventral tegmental area

INTRODUCTION

Cannabinoid type 1 (CB1) receptors modulate the behavioral responses induced by nicotine, the addictive component of tobacco. For example, mice bearing a genetic deletion of the CB1 receptor develop neither nicotine-induced hyperactivity (Castane *et al.* 2002) nor nicotine-induced conditioned place preference (Castane *et al.* 2002;Merritt *et al.* 2008). Similarly, pharmacological blockade of CB1 receptors by the administration of a selective antagonist, such as SR141716A or AM 251, decreases nicotine-induced conditioned place preference (Le Foll & Goldberg 2004;Forget;Hamon & Thiebot 2005) as well as cue-induced reinstatement of nicotine-seeking behavior (Cohen *et al.* 2002;Cohen *et al.* 2005). In addition, peripheral administration of a selective CB1 antagonist also dramatically reduces nicotine intravenous self-administration (IVSA) under a regular fixed ratio schedule or second order reinforcement schedule in rats (Shoaib 2008;Wing & Shoaib 2010). However, the neural substrates through which cannabinoid CB1 receptors regulate nicotine voluntary intake remain to be elucidated.

The activation of dopaminergic (DA) pathways by nicotine depends on a functional balance between excitatory and inhibitory inputs to the ventral tegmental area (VTA) DA neurons (Mansvelder;Keath & McGehee 2002) as well as on the direct stimulant effect of nicotine on VTA DA neurons (McGranahan *et al.* 2011). As with other drugs of abuse, the reinforcing properties of nicotine ultimately involve an increase in dopaminergic neurotransmission in the nucleus accumbens (NAC) (Corrigall *et al.* 1992;Pontieri *et al.* 1996;Pidoplichko *et al.* 2004). Accordingly, it has been shown that disruption of the mesolimbic DA system decreases the reinforcing properties of nicotine and reduces voluntary intake of the drug (Corrigall *et al.* 1992). Brain mapping studies in the rodent indicated a ubiquitous distribution of CB1 receptors, with a dense expression in the limbic areas (Tsou *et al.* 1998). More recently, correlative studies have suggested that nicotine-induced dopamine release in the nucleus accumbens is prevented by a cannabinoid CB1 receptor antagonist injected either peripherally or locally in the NAC (Cohen *et al.* 2002;Cheer *et al.* 2007). Altogether these data suggest that the CB1 receptors that locally modulate midbrain DA neurons may also regulate nicotine intravenous self-administration.

Thus, the aim of the present study was to test whether local injections of a selective CB1 receptor antagonist into the VTA or NAC would decrease voluntary intravenous nicotine intake in rats. We found that selective blockade of CB1 receptors in the VTA

specifically decreased self-administration of nicotine, while non-specific operant behavior was not affected.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

Sprague Dawley rats weighing 175–200 g at the beginning of the experiment (Charles River Laboratories, France) were housed collectively (3/cage) and maintained in temperature-controlled vivariums (22±1°C) with a reversed 12-hour light/dark cycle (lights off at 9:30 A.M.). Water and food were available *ad libitum*, except during operant self-administration experiments (see below). All procedures were conducted in strict accordance with the European directive (86/609/EEC) and with the approval of the Centre National de la Recherche Scientifique. Experiments started after 1 week of acclimatization and were conducted at the beginning of the dark cycle.

Surgery

First, intravenous catheter surgeries were carried out. Animals were anesthetized with a mixture of xylazine (7.5 mg/kg) and ketamine (75 mg/kg) injected intraperitoneally (i.p.). As previously described (Caille *et al.* 2009), a silastic catheter was implanted in the right jugular vein, secured with sutures, and exited on the rat's back, posterior to the shoulder blades. Animals were given a minimum of 5 days of post-operative recovery prior to the initiation of self-administration training. Catheters were flushed daily with a heparinized saline solution (300 UI/ml; 0.2 ml/rat) containing ampicillin (0.1 mg/ml, Ampiject, Coophavet).

When the nicotine self-administration pattern was stable, rats were implanted with intracerebral guide cannulae. Animals were anesthetized with the same anesthetic mixture as previously and placed in a stereotaxic apparatus (Kopf Instruments). Bilateral guide cannulae were aimed at 2 mm above the VTA (n=13; from Bregma: antero-posterior= -5.3 mm, lateral=±0.8 mm, dorso-ventral=−8.2 mm) or the NAC (n=9; from Bregma: antero-posterior= +1.7 mm, lateral=±1.7 mm, dorso-ventral=−5.0 mm) according to the atlas of Paxinos and Watson. Guide cannulae were anchored to the skull with screws and dental cement.

Operant behavior

Apparatus. Rats were tested in standard operant chambers (30 cm × 40 cm × 37 cm) located in a dimly lit room with a background white noise (Imetronic, France). For nicotine self-administration, boxes were equipped with two nose-poke devices, whereas two retractable levers (2 cm x 4 cm x 1 cm) were used for oral water self-administration training. For nicotine self-administration, a spring-covered Tygon tube connected the animal's catheter to a syringe (placed outside the chamber) containing a nicotine solution. For water self-administration, a drinking reservoir was positioned 4 cm above the grid floor, equidistant to the two levers, and connected to a syringe filled with water (placed outside the chamber). The start of the self-administration session was indicated by illumination of the house light. Activation of the active device resulted in a 4-sec delivery of intravenous nicotine or water in the liquid dispenser, accompanied by the illumination of a white cue-light positioned above the active device. Inactive responses were recorded but had no programmed consequences. A microcomputer controlled the delivery of fluids and presentation of visual stimuli and recorded behavioral data.

Nicotine intravenous self-administration. Rats were placed on a 20 g/day food restriction schedule for the entire nicotine self-administration experiment, and trained for nicotine IVSA under a fixed ratio (FR) schedule of reinforcement (10 days FR1; 3 days FR2; remaining days FR5). Activation of the active nose-poke resulted in the infusion of 0.1 ml of nicotine (30 µg/kg/infusion) over 4 sec and the illumination of a white cue-light positioned above the nose-poke hole. A 20-sec time-out followed each infusion whereby activation of the active nose-poke had no consequences. The daily food ration was given after each self-administration session.

Water oral self-administration. Animals (n=8) were placed on a 21h/day water restriction schedule for the entire oral self-administration experiment (Caillé & Parsons 2003). Rats were trained to lever press for water (0.120 ml/volume) on FR1. Active presses allowed the delivery of water over 4 sec, and the illumination of a white cue-light positioned above the active lever. There was no time-out period. Daily sessions lasted for 30 min following which rats were given access to water for an additional 2 hours 30 min in their home cage.

Experimental Design

Rats were tested with the CB1 receptor antagonist when variation in operant responding was less than 20 % from baseline. Immediately before each test session, rats received intracerebral injections of AM 251, a selective CB1 antagonist, at the following doses: 0, 1 and 10 µg/0.5µl/side (AM0, AM1 and AM10) for nicotine self-administration, and 0 or 10µg/0.5µl/side (AM0 and AM10, n=8) for water self-administration. All doses were tested in a random order. Stylets were removed from the cannulae and bilateral injectors were inserted, extending 2 mm beyond the tip of the guide cannulae. Infusions were made over a 3-min period and cannulae were left in place for one additional minute to avoid reflux inside the guide cannulae and to allow drug diffusion. Subsequently, the stylets were replaced and the rats were allowed immediate access to operant self-administration.

At the end of the nicotine experiments, rats were challenged with a peripheral injection of AM 251 at the doses of 0 and 2mg/kg i.v. (AM0iv, AM2iv) immediately before access to nicotine intravenous self-administration.

Drugs

Nicotine hydrogen tartrate (Sigma Aldrich, France) was dissolved in sterile physiological saline (0.9%). AM 251 (Tocris, United Kingdom) was dissolved in a vehicle of 0.25% DMSO (Sigma Aldrich, France) 0.25% Cremophor (Sigma Aldrich, France) and Ringer solution.

Histology

After each experiment, the rats were euthanized by anesthetic overdose and the brain was removed and immediately frozen on dry ice. Subsequently, the brain was mounted on a cryostat and sliced into 50 mm sections. Injector tip placements were then verified. Only those subjects with accurate placement were included in the final data analyses.

Statistical analysis

Results are expressed throughout as mean ± SEM. Multiple comparisons from nicotine IVSA were analyzed by performing analysis of variance (ANOVA) with repeated measures. Post hoc comparisons were performed by Fisher's PLSD test. Water oral self-administration data were compared using a paired Student's t test. In all cases, differences with a $p \leq 0.05$ were considered significant.

RESULTS

Effect of intracerebral injections of AM 251 on intravenous nicotine self-administration

Rats performed about 35 consecutive training sessions before central injections of AM 251 were started. During the final three self-administration sessions prior to the AM 251 test sessions, rats expressed stable levels of operant responding for nicotine IVSA with a good discrimination rate between active and inactive responses [VTA group : $F(1;12)=35.62$; $p<0.0001$ and NAC group : $F(1;8)=32.44$; $p<0.001$]. Rats in the VTA group obtained an average of 17 ± 2 nicotine reinforcers per session and rats in the NAC group obtained 13 ± 2 nicotine infusions. Further analysis showed that the effects of central inhibition of CB1 receptors depended on the structure targeted.

Intra-VTA injections of AM 251 (see figure 1 a) dose-dependently decreased active responding for nicotine (AM0: 101 ± 17, AM1: 80 ± 13 and AM10: 57±11) [$F(2, 24)= 4.46$, $p=0.02$; post-hoc AM0 vs. AM10 $p=0.006$]. Inactive responses were slightly but not significantly decreased (AM0: 51 ± 20, AM1: 36 ± 9 and AM10: 24 ± 8) [$F(2, 24)= 1.33$, $p=0.29$ n.s.). Total number of injections was also reduced (AM0: 16.0 ± 2.3, AM1: 13.6 ± 2.1 and AM10: 9.9 ± 1.5) [$F(2, 24)= 4.09$, $p=0.03$; post-hoc AM0 vs. AM10 $p=0.009$], the highest dose of AM 251 lowering the total nicotine intake to 61.9 % of baseline (figure 1b).

Intra-NAC injections of AM 251 did not significantly alter nicotine IVSA (see figure 2 a and b). Both active (AM0: 81 ± 11, AM1: 63 ± 13 and AM10: 73.8 ± 17.9) and inactive (AM0: 21 ± 5, AM1: 17.8 ± 5.0 and AM10: 36 ± 15) responses remained stable after AM 251 pretreatment [interaction AM 251 x responses $F(2, 16)= 1.11$, $p=0.35$ n.s.]. The total number of nicotine infusions was not altered (AM0: 14 ± 1, AM1: 12 ± 2 and AM10: 13 ± 2.6) [$F(2, 24)= 0.17$, $p=0.85$)]. Pretreatment with AM 251 had no consequences on nicotine intake compared to baseline level (Figure 2 b).

Effect of intracerebral injections of AM 251 on motivated responding for water

Test sessions for intra-VTA injections of AM 251 began when oral water self-administration was stable over three training sessions (active responses: 86 ± 10, inactive responses: 3 ± 1, and reinforcers: 82 ± 10). There was no significant effect of intra-VTA AM 251 pretreatment on responding for water (AM0: 72 ± 13 and AM10: 72 ± 16, AM0 vs. AM10 Student's t test non significant) (see Figure 3).

Effect of peripheral administration of AM 251 on nicotine self-administration

Peripheral administration of AM 251 significantly decreased the number of nicotine infusions (AM0iv=13.0 ± 1.2, AM2iv=5.3 ± 0.6 injections; AM0iv vs. AM2iv, Student's t test $t(22)= 6.87$, $p<0.001$) as well as the number of reinforced [AM0iv= 82.0 ± 9.8, AM2iv= 29.9 ± 3.5; $t(22)=6.27$, $p<0.001$] and non reinforced responses for nicotine [AM0iv= 30.3 ± 4.5, AM2iv= 14.9 ± 3.5; $t(22)=4.19$, $p<0.001$] (data not shown).

DISCUSSION

Acute peripheral administration of the CB1 receptor antagonist AM 251 blocks the reinforcing properties of nicotine, and correlative studies have shown that it also decreases nicotine-induced DA release in the nucleus accumbens (Cohen *et al.* 2002;Cheer *et al.* 2007). However, the neurobiological substrates through which this occurs remain to be determined. The present study first confirms that acute peripheral blockade of CB1 receptors dramatically decreases the primary reinforcing value of nicotine and reduces nicotine taking in the IVSA paradigm. Secondly, it provides strong evidence that CB1 receptors in the VTA, and not the NAC, modulate voluntary nicotine intake in trained rats. This study also shows that the decrease in nicotine intake by AM 251 is not a secondary effect resulting from a general inhibition of operant behavior but is specific to nicotine reinforcement, since VTA infusion of the CB1 antagonist does not alter oral self-administration of water in water-deprived animals.

The reinforcing and DA releasing effects of nicotine have been principally ascribed to an action in the VTA (Corrigall;Coen & Adamson 1994;Nisell;Nomikos & Svensson 1994;David *et al.* 2006). However, several studies have suggested that DA release in the NAC is another potential candidate for the regulation of nicotine reward and related processes. Acute peripheral cannabinoid and non-cannabinoid pretreatments, which have been shown to prevent nicotine reward, robustly decrease nicotine-induced DA release in the NAC (Cohen *et al.* 2002;Exley *et al.* 2008;Luchicchi *et al.* 2010;Exley *et al.* 2011). Moreover, intra-NAC injections of SR141716A dramatically reduce opiate and alcohol reinforcement in self-administering rats (Caille & Parsons 2006;Caille *et al.* 2007). Thus we sought to examine the specific role of NAC CB1 receptors in the modulation of nicotine reinforcement. In accordance with the fact that nicotine reward depends on DA terminal modulation (Exley *et al.* 2008) and that DA terminals lack CB1 receptors (Riegel & Lupica 2004;Lupica & Riegel

2005), our results confirm that the CB1-mediated mechanism responsible for alterations in nicotine reinforcement does not occur at the level of NAC DA terminals.

Interestingly, in vitro studies have indicated that endocannabinoids released in the VTA from DA-depolarized neurons activate CB1 receptors located presynaptically on GABA terminals, to produce depolarization-suppressed inhibition (DSI) (Lupica & Riegel 2005). Similarly, CB1-dependent depolarization-suppressed excitation (DSE) has been reported for VTA glutamatergic terminals (Melis *et al.* 2004;Lupica & Riegel 2005). Furthermore, VTA CB1 receptors are located more densely on inhibitory terminals than on excitatory synapses (Lupica & Riegel 2005). Altogether, these findings suggest that nicotine-induced DA depolarization would depend on CB1 receptor control over GABAergic rather than glutamatergic terminals. Consistent with this idea is the observation in the present study that intra-VTA infusion of AM 251 robustly and specifically reduces nicotine intake in rats under the FR5 schedule of reinforcement. This observation suggests that AM 251 increases the influence of GABA inputs in the regulation of VTA DA neurons by blocking DSI. However, the relative contribution of CB1 receptors on both GABA and glutamate terminals, and its contribution to nicotine reinforcement, remain to be demonstrated.

A recent study has provided new insights into the role of VTA alpha7-nicotinic receptors in nicotine-induced reinforcement (Besson *et al.* 2011). Alpha7-nicotinic receptors are localized on VTA glutamatergic terminals (Jones & Wonnacott 2004) and control glutamate release (Pidoplichko *et al.* 1997). Thus, glutamate inputs control DA neuron activity and, subsequently, volitional nicotine intake (Kenny *et al.* 2009). Interestingly, alpha7-nicotinic receptors have been proposed as a new target for the abuse of cannabis, a CB1 receptor agonist(Solinas *et al.* 2007). Moreover, localizations of Alpha7-nicotinic and CB1 cannabinoid receptors often overlap. Altogether, these findings suggest a possible interaction between alpha7-nicotinic and CB1 cannabinoid receptors that may potentiate firing of VTA glutamate terminals. Therefore, the hypothesis here would be that an intra-VTA infusion of the CB1 antagonist AM 251 disrupts the cross-talk between these two receptors, decreases nicotine-induced VTA glutamate signaling and, consequently, reduces nicotine-self-administration.

Finally, although several studies have reported that the CB1 receptor is a key element in nicotine reinforcement, it has also been shown that complete genetic ablation of the CB1

receptor fails to prevent nicotine IVSA behavior (Cossu *et al.* 2001). Accordingly, the present findings show that even though the highest dose of AM 251 into the VTA drops nicotine self-administration to 53% of baseline, it fails to fully inhibit nicotine taking. Thus there might be, in the VTA, other putative candidates for the control of nicotine reinforcement, such as endogenous ligands to the nuclear receptor-transcription factor peroxisome proliferator-activated receptors type-alpha (PPAR-alpha). PPAR-alpha regulates basal and acute nicotine-induced activity of VTA neurons (Melis *et al.* 2008;Mascia *et al.* 2011), and controls acute nicotine-induced DA release in the NAC (Luchicchi *et al.* 2010). In addition, acute peripheral treatment with a PPAR-alpha agonist inhibits both nicotine taking and nicotine seeking behavior in monkeys and rats (Mascia *et al.* 2011). However, the role of VTA PPAR-alpha receptors on the modulation of nicotine intravenous self-administration remains to be investigated.

In conclusion, our results demonstrate that CB1 receptors located in the VTA, but not the NAC, are critical in the control of nicotine IVSA. Further experiments are needed to disentangle the relative contribution of CB1 receptors from the other potential candidates in the VTA that may contribute to nicotine reinforcement and, thus, to the maintenance of the nicotine taking habit.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by grants from Centre National de la Recherche Scientifique, University of Bordeaux, Agence Nationale de la Recherche and Region Aquitaine. The authors would like to thank Julia Slown-Murphy for editorial assistance.

REFERENCES

BESSON M, DAVID V, BAUDONNAT M, CAZALA P, GUILLOUX JP, REPERANT C, CLOEZ-TAYARANI I, CHANGEUX JP, GARDIER AMGRANON S (2011) Alpha7-nicotinic receptors modulate nicotine-induced reinforcement and extracellular dopamine outflow in the mesolimbic system in mice, *Psychopharmacology (Berl)*.

CAILLE S, ALVAREZ-JAIMES L, POLIS I, STOUFFER DGPARSONS LH (2007) Specific alterations of extracellular endocannabinoid levels in the nucleus accumbens by ethanol, heroin, and cocaine self-administration, *J Neurosci*, 27, 3695-3702.

CAILLE S, GUILLEM K, CADOR M, MANZONI OGEORGES F (2009) Voluntary nicotine consumption triggers in vivo potentiation of cortical excitatory drives to midbrain dopaminergic neurons, *J Neurosci*, 29, 10410-10415.

CAILLE SPARSONS LH (2006) Cannabinoid modulation of opiate reinforcement through the ventral striatopallidal pathway, *Neuropsychopharmacology*, 31, 804-813.

CAILLÉ SPARSONS LH (2003) SR141716A reduces the reinforcing properties of heroin but not heroin-induced increases in the nucleus accumbens in rats, *Eur J Neurosci*, 18, 3145-3149.

CASTANE A, VALJENT E, LEDENT C, PARMENTIER M, MALDONADO RVALVERDE O (2002) Lack of CB1 cannabinoid receptors modifies nicotine behavioural responses, but not nicotine abstinence, *Neuropharmacology*, 43, 857-867.

CHEER JF, WASSUM KM, SOMBERS LA, HEIEN ML, ARIANSEN JL, ARAGONA BJ, PHILLIPS PEWIGHTMAN RM (2007) Phasic dopamine release evoked by abused substances requires cannabinoid receptor activation, *J Neurosci*, 27, 791-795.

COHEN C, PERRAULT G, GRIEBEL GSOUBRIE P (2005) Nicotine-associated cues maintain nicotine-seeking behavior in rats several weeks after nicotine withdrawal: reversal by the cannabinoid (CB1) receptor antagonist, rimonabant (SR141716), *Neuropsychopharmacology*, 30, 145-155.

COHEN C, PERRAULT G, VOLTZ C, STEINBERG RSOUBRIE P (2002) SR141716, a central cannabinoid (CB(1)) receptor antagonist, blocks the motivational and dopamine-releasing effects of nicotine in rats, *Behav Pharmacol*, 13, 451-463.

CORRIGALL WA, COEN KMADAMSON KL (1994) Self-administered nicotine activates the mesolimbic dopamine system through the ventral tegmental area, *Brain Res*, 653, 278-284.

CORRIGALL WA, FRANKLIN KB, COEN KMCLARKE PB (1992) The mesolimbic dopaminergic system is implicated in the reinforcing effects of nicotine, *Psychopharmacology (Berl)*, 107, 285-289.

COSSU G, LEDENT C, FATTORE L, IMPERATO A, BOHME GA, PARMENTIER MFRATTA W (2001) Cannabinoid CB1 receptor knockout mice fail to self-administer morphine but not other drugs of abuse, *Behav Brain Res*, 118, 61-65.

DAVID V, BESSON M, CHANGEUX JP, GRANON SCAZALA P (2006) Reinforcing effects of nicotine microinjections into the ventral tegmental area of mice: dependence on cholinergic nicotinic and dopaminergic D1 receptors, *Neuropharmacology*, 50, 1030-1040.

EXLEY R, CLEMENTS MA, HARTUNG H, MCINTOSH JMCRAGG SJ (2008) Alpha6-containing nicotinic acetylcholine receptors dominate the nicotine control of dopamine neurotransmission in nucleus accumbens, *Neuropsychopharmacology*, 33, 2158-2166.

EXLEY R, MAUBOURGUET N, DAVID V, EDDINE R, EVRARD A, PONS S, MARTI F, THRELFELL S, CAZALA P, MCINTOSH JM, CHANGEUX JP, MASKOS U, CRAGG SJFAURE P (2011) Distinct contributions of nicotinic acetylcholine receptor subunit alpha4 and subunit alpha6 to the reinforcing effects of nicotine, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 7577-7582.

FORGET B, HAMON MTHIEBOT MH (2005) Cannabinoid CB1 receptors are involved in motivational effects of nicotine in rats, *Psychopharmacology (Berl)*, 181, 722-734.

JONES IWWONNACOTT S (2004) Precise localization of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors on glutamatergic axon terminals in the rat ventral tegmental area, *J Neurosci*, 24, 11244-11252.

KENNY PJ, CHARTOFF E, ROBERTO M, CARLEZON WA, JR.MARKOU A (2009) NMDA receptors regulate nicotine-enhanced brain reward function and intravenous nicotine self-administration: role of the ventral tegmental area and central nucleus of the amygdala, *Neuropsychopharmacology*, 34, 266-281.

LE FOLL BGOLDBERG SR (2004) Rimonabant, a CB1 antagonist, blocks nicotine-conditioned place preferences, *Neuroreport*, 15, 2139-2143.

LUCHICCHI A, LECCA S, CARTA S, PILLOLLA G, MUNTONI AL, YASAR S, GOLDBERG SRPISTIS M (2010) Effects of fatty acid amide hydrolase inhibition on neuronal responses to nicotine, cocaine and morphine in the nucleus accumbens shell and ventral tegmental area: involvement of PPAR-alpha nuclear receptors, *Addict Biol*, 15, 277-288.

LUPICA CRRIEGEL AC (2005) Endocannabinoid release from midbrain dopamine neurons: a potential substrate for cannabinoid receptor antagonist treatment of addiction, *Neuropharmacology*, 48, 1105-1116.

MANSVELDER HD, KEATH JRMCGEHEE DS (2002) Synaptic mechanisms underlie nicotine-induced excitability of brain reward areas, *Neuron*, 33, 905-919.

MASCIA P, PISTIS M, JUSTINOVA Z, PANLILIO LV, LUCHICCHI A, LECCA S, SCHERMA M, FRATTA W, FADDA P, BARNES C, REDHI GH, YASAR S, LE FOLL B, TANDA G, PIOMELLI DGOLDBERG SR (2011) Blockade of nicotine reward and reinstatement by activation of alpha-type peroxisome proliferator-activated receptors, *Biol Psychiatry*, 69, 633-641.

MCGRANAHAN TM, PATZLAFF NE, GRADY SR, HEINEMANN SFBOOKER TK (2011) alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors on dopaminergic neurons mediate nicotine reward and anxiety relief, *J Neurosci*, 31, 10891-10902.

MELIS M, PILLOLLA G, LUCHICCHI A, MUNTONI AL, YASAR S, GOLDBERG SRPISTIS M (2008) Endogenous fatty acid ethanolamides suppress nicotine-induced activation of mesolimbic dopamine neurons through nuclear receptors, *J Neurosci*, 28, 13985-13994.

MELIS M, PISTIS M, PERRA S, MUNTONI AL, PILLOLLA GGESSA GL (2004) Endocannabinoids mediate presynaptic inhibition of glutamatergic transmission in rat ventral tegmental area dopamine neurons through activation of CB1 receptors, *J Neurosci*, 24, 53-62.

MERRITT LL, MARTIN BR, WALTERS C, LICHTMAN AHDAMAJ MI (2008) The endogenous cannabinoid system modulates nicotine reward and dependence, *J Pharmacol Exp Ther*, 326, 483-492.

NISELL M, NOMIKOS GGSVENSSON TH (1994) Systemic nicotine-induced dopamine release in the rat nucleus accumbens is regulated by nicotinic receptors in the ventral tegmental area, *Synapse*, 16, 36-44.

PIDOPLICHKO VI, DEBIASI M, WILLIAMS JTDANI JA (1997) Nicotine activates and desensitizes midbrain dopamine neurons, *Nature*, 390, 401-404.

PIDOPLICHKO VI, NOGUCHI J, AREOLA OO, LIANG Y, PETERSON J, ZHANG TDANI JA (2004) Nicotinic cholinergic synaptic mechanisms in the ventral tegmental area contribute to nicotine addiction, *Learn Mem*, 11, 60-69.

PONTIERI FE, TANDA G, ORZI FDI CHIARA G (1996) Effects of nicotine on the nucleus accumbens and similarity to those of addictive drugs, *Nature*, 382, 255-257.

RIEGEL ACLUPICA CR (2004) Independent presynaptic and postsynaptic mechanisms regulate endocannabinoid signaling at multiple synapses in the ventral tegmental area, *J Neurosci*, 24, 11070-11078.

SHOAIB M (2008) The cannabinoid antagonist AM251 attenuates nicotine self-administration and nicotine-seeking behaviour in rats, *Neuropharmacology*, 54, 438-444.

SOLINAS M, SCHERMA M, FATTORE L, STROIK J, WERTHEIM C, TANDA G, FRATTA WGOLDBERG SR (2007) Nicotinic alpha 7 receptors as a new target for treatment of cannabis abuse, *J Neurosci*, 27, 5615-5620.

TSOU K, BROWN S, SANUDO-PENA MC, MACKIE KWALKER JM (1998) Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system, *Neuroscience*, 83, 393-411.

WING VCSHOAIB M (2010) Second-order schedules of nicotine reinforcement in rats: effect of AM251, *Addict Biol*, 15, 393-402.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Effect of AM 251 infusions into the Ventral Tegmental Area (VTA) on intravenous nicotine self-administration in rats. Two-hour nicotine (30 µg/kg/0.1 ml) self-administration sessions occurred daily until tests with AM 251 at 0, 1 and 10 µg/0.5 µl/side. a) Effect of AM 251 on the number of active nose-pokes during 2 hrs. b) Effects of AM 251 on nicotine reinforcers expressed as % of baseline. All rats (n=13) were tested randomly with all doses of CB1 receptor antagonist. *Post-hoc* AM0 vs. AM10, **p<0.01 in both a) and b).

Figure 2: Effect of AM 251 infusions into the Nucleus Accumbens (NAC) on intravenous nicotine self-administration in rats. Two-hour nicotine (30 µg/kg/0.1 ml) self-administration sessions occurred daily until tests with AM 251 at 0, 1 and 10 µg/0.5 µl/ side. a) Effect of AM 251 on the number of active nose-pokes during 2 hrs. b) Effects of AM 251 on nicotine reinforcers expressed as % of baseline. All rats (n=9) were tested randomly with all doses of CB1 receptor antagonist. ANOVAs, p values non significant in both a) and b).

Figure 3: Effect of AM 251 infusions into the Ventral Tegmental Area (VTA) on oral water self-administration in rats. Thirty-minute self-administration sessions occurred daily until tests with AM 251 at 0 and 10 µg/0.5 µl/ side. Level of operant responding is represented in black histograms for active presses and grey histograms for inactive presses during 30 min. All rats (n=8) were tested randomly with all doses of CB1 receptor antagonist. Data are mean± S.E.M. ANOVA, AM 251 x lever interaction p value non significant.

FIGURE 1

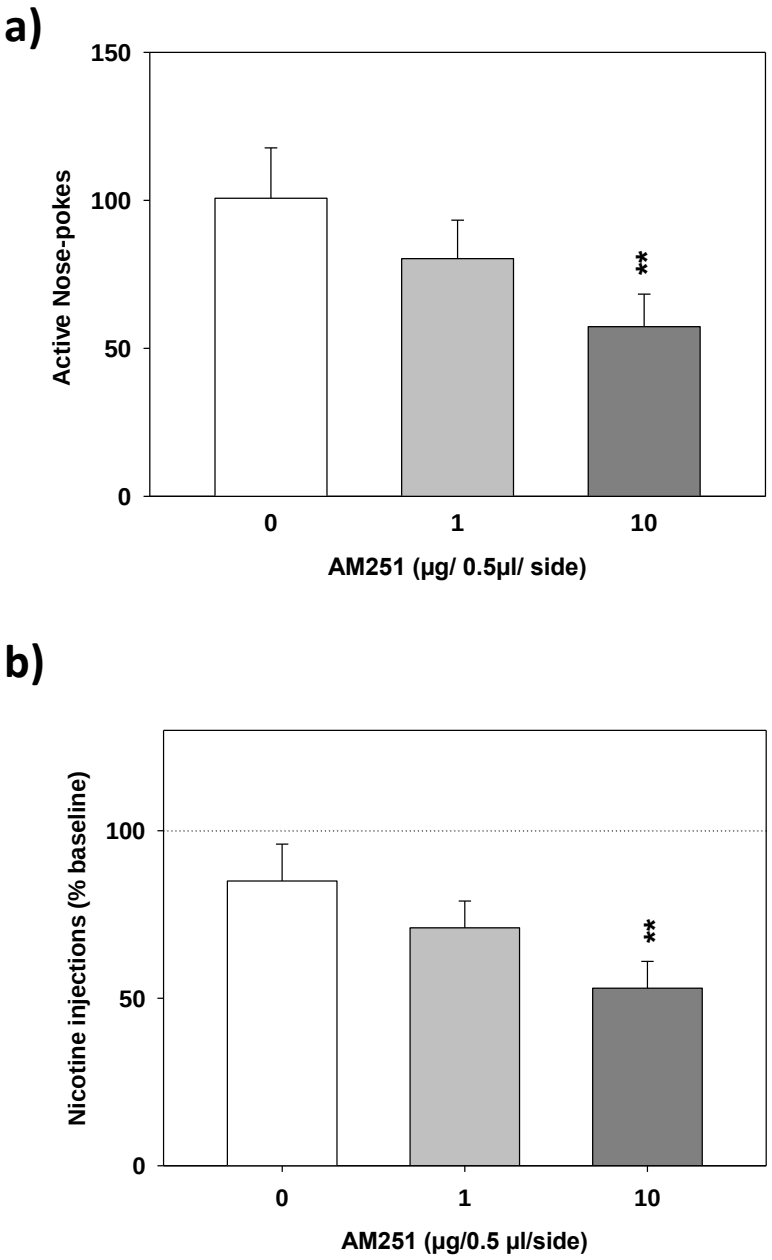
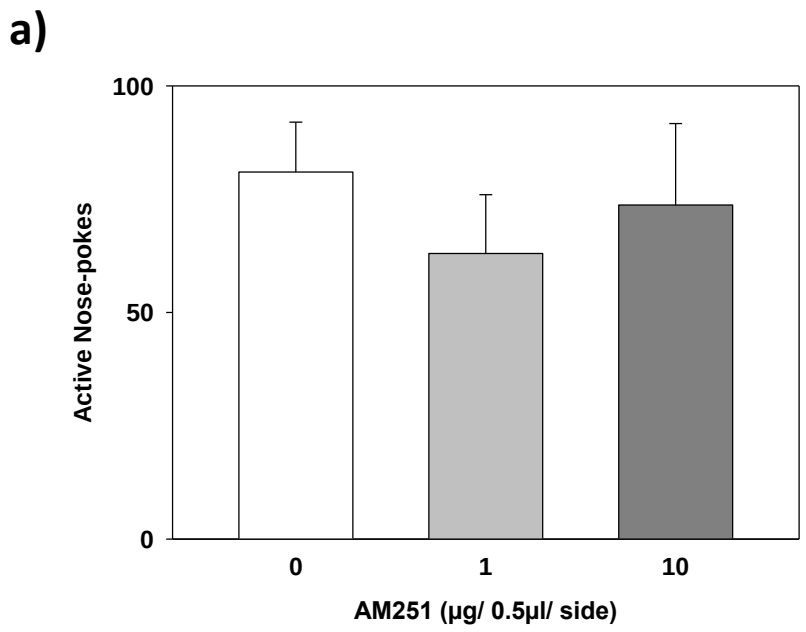

a)
150
100
50
0
Active Nose-pokes
**
0
1
10
AM251 (µg/ 0.5µl/ side)
b)
100
50
0
Nicotine injections (% baseline)
**
0
1
10
AM251 (µg/0.5 µl/side)

FIGURE 2


a)
100
50
0
Active Nose-pokes
0
1
10
AM251 (µg/ 0.5µl/ side)

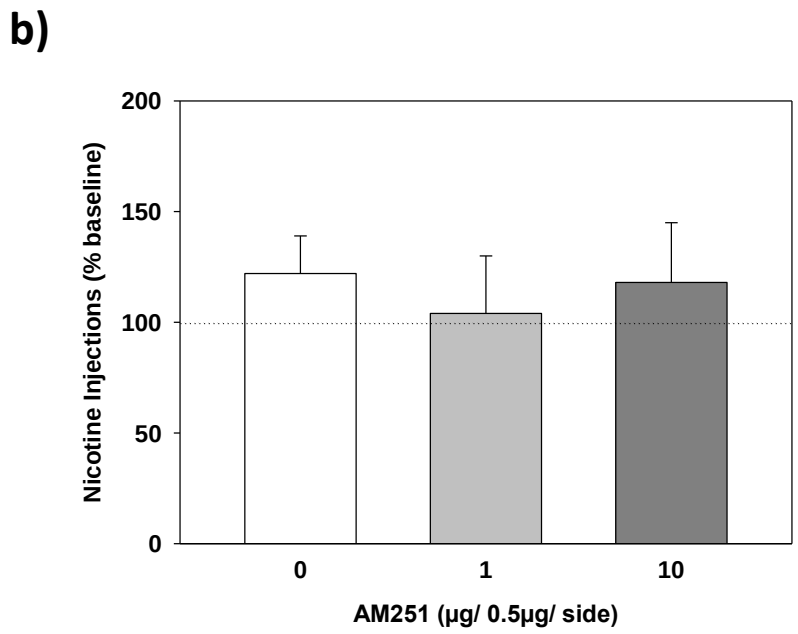
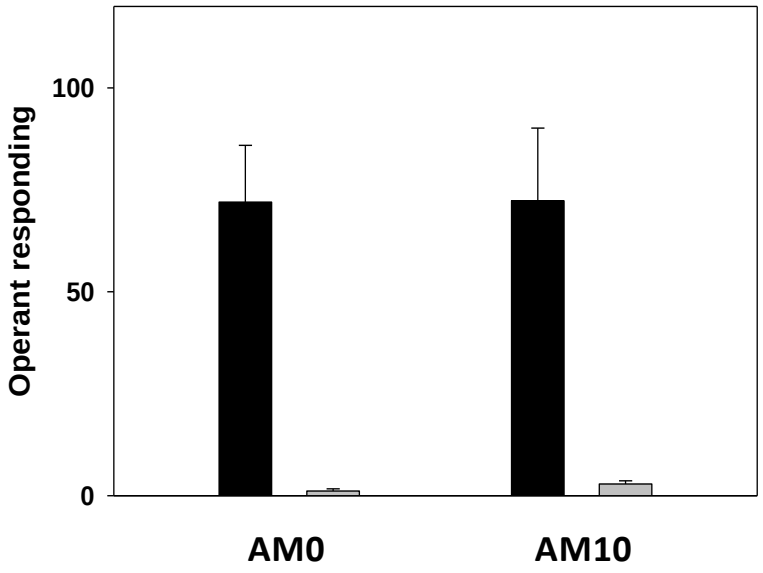

b)
200
150
100
50
0
Nicotine Injections (% baseline)
0
1
10
AM251 (µg/ 0.5µg/ side)

FIGURE 3



PARTIE 2 : Effet de l'augmentation chronique de l'anandamide sur les propriétés incitatives de la nicotine, des stimuli associés à sa prise et sur le phénotype émotionnel des rats abstinents

I. Introduction

Découvert dans les années 1990, le récepteur CB1 est d'abord proposé comme cible thérapeutique pour le traitement de l'obésité avec la synthèse d'antagonistes sélectifs dont l'action principale est de diminuer la prise alimentaire (Ravinet Trillou et al., 2003; Despres et al., 2005; Pi-Sunyer et al., 2006; Scheen et al., 2006). Rapidement, il est envisagé d'utiliser ce potentiel « coupe-faim » pour lutter contre la prise de poids associée au sevrage tabagique (Cahill and Ussher, 2007). Par ailleurs, l'action de l'antagoniste est double, puisque des études ont également mis en évidence que le blocage aigu des récepteurs CB1 entraine une diminution des propriétés renforçantes de la nicotine (Cohen et al., 2002; Le Foll et al., 2008; Shoaib, 2008) et également une diminution des propriétés incitatives de la drogue chez les sujets abstinents (Cohen et al., 2005a; Le Foll et al., 2008).

De façon paradoxale, des études ont également montré que la motivation pour la nicotine peut être bloquée par l'augmentation aigue du « tonus » eCB via l'administration d'un inhibiteur de l'enzyme de dégradation de l'AEA, qui prolonge les effets de l'AEA dans les sites où il est libéré. Par exemple, l'injection systémique aiguë de l'URB597 (inhibiteur de la FAAH) attenue la recherche compulsive de nicotine dans le modèle d'auto-administration de nicotine chez le rat comme chez le primate. Par ailleurs, l'injection systémique aiguë d'URB597 atténue également l'expression de la préférence de place conditionnée induite par la nicotine (Scherma et al., 2008a; Scherma et al., 2008c; Forget et al., 2009). Cependant, la critique majeure de différentes approches est qu'elles examinent essentiellement les effets aigus des traitements sur les composantes motivationnelles testées à très court terme, immédiatement après l'intoxication et l'épisode de dépendance. La modulation indirecte des récepteurs CB1 via l'URB597 semble ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques pour le sevrage tabagique. Il est donc essentiel : i) de vérifier l'effet du traitement chronique avec cette molécule chez le sujet abstinent et ii) de déterminer si le traitement chronique se révèle également efficace pour diminuer la motivation persistante pour la nicotine.

Par ailleurs, le récepteur CB1 est le récepteur le plus représenté dans l'ensemble du SNC ce qui le positionne comme le modulateur privilégié d'une multitude de fonctions. Plus particulièrement, ce qui nous intéresse pour ce travail de recherche, c'est que le SEC soit un modulateur puissant de la sphère émotionnelle chez le rat. Par exemple, il est important de noter que les souris déficientes pour les récepteurs cannabinoïdes CB1 présentent un état basal plus anxieux et une plus grande susceptibilité à développer un comportement de type

dépressif (Martin et al., 2002). Ces données suggèrent donc l'activation de récepteurs CB1 comme cible thérapeutique pour le développement de traitement contre l'anxiété et la dépression. Cependant, l'administration d'un agoniste directe des récepteurs CB1 possède un mode d'action biphasique et produit un effet anxiolytique à faible dose et anxiogène à plus forte dose (Patel and Hillard, 2006; Scherma et al., 2008b). Il a alors été proposé de stimuler les récepteurs CB1 indirectement par l'inhibition de la FAAH, méthode qui permet d'obtenir un effet anxiolytique dose dépendant sans l'occurrence d'effet anxiogène à forte dose (Kathuria et al., 2003; Patel and Hillard, 2006; Naidu et al., 2007; Moreira et al., 2008; Scherma et al., 2008b).

Cependant, il est important de soulever le problème suivant : la plupart des études ne s'intéressent qu'à l'effet aigu de ces molécules, dans des conditions éloignées des conditions thérapeutiques réelles, ce qui questionne sur l'efficacité du SEC comme site d'action privilégié pour le traitement *chronique* des déficits émotionnels et dans notre cas particulier, dans le traitement de la dépendance tabagique. En effet, une action pharmacologique chronique sur le SEC engendre souvent des effets secondaires trop délétères. Par exemple, l'utilisation chronique d'un antagoniste CB1 chez l'homme dans le cadre d'essais cliniques comme traitement de l'obésité et du tabagisme a conduit à l'apparition de symptômes anxieux et au retrait de cette molécule du marché (Christensen et al., 2007; Rucker et al., 2007; Akbas et al., 2009; Le Foll et al., 2009; Moreira and Crippa, 2009). Il est donc nécessaire d'examiner plus précisément, le contrôle des récepteurs CB1 sur les propriétés renforçantes de la nicotine et de déterminer par quelle voie spécifique l'excès d'eCB disponibles peut conduire à une altération de la sphère émotionnelle chez les sujets abstinents à la nicotine.

Mon hypothèse est la suivante : la prise volontaire de nicotine entraine une augmentation persistante de l'AEA disponible chez le rat, même au cours de l'abstinence prolongée. Le traitement chronique avec un inhibiteur de dégradation de l'AEA aurait alors pour conséquence de produire une désensibilisation des récepteurs CB1 et donc de diminuer les effets incitateurs de la nicotine, réduisant ainsi la recherche de drogue quand elle est réintroduite dans le système. Cependant, une désensibilisation trop importante des CB1 pourrait également impliquer des modifications des comportements anxieux par une voie indépendante des récepteurs CB1.

Pour tester cette hypothèse, nous avons induit un état de dépendance à la nicotine chez des rats. Lors du sevrage, nous avons observé l'effet de l'inhibition chronique de l'enzyme de dégradation de l'anandamide sur les propriétés incitatives de la nicotine et sur la composante émotionnelle (anxiété, dépression). Il est donc important de noter que tous les tests réalisés

dans cette étude ont pour but de tester l'effet chronique de l'URB597, ainsi l'administration du traitement a toujours lieu en fin de journée.

II. Protocoles expérimentaux

II.A. Histoire pharmacologique des animaux

Dans un premier temps, les rats sont rendus dépendants à la nicotine par une exposition chronique de 8 semaines dans un modèle d'auto-administration intraveineuse de nicotine (60µg nicotine base /kg /0.1 ml). A la fin de la période d'auto-administration, les rats sont mis en abstinence pendant une semaine au cours de laquelle certaines composantes comportementales sont examinées (cf paragraphe II.D). Les rats sont ensuite répartis en deux groupes homogènes dans lesquels les quantités totales de nicotine consommée sont égales et commencent le traitement chronique avec l'inhibiteur de l'enzyme de dégradation de l'AEA. Un groupe est traité avec l'URB597 (0.3mg/kg/jour) (**Nicotine URB**, NU n=20) et l'autre groupe reçoit le solvant (**Nicotine Solvant**, NS, n=19). Le groupe de rats exposé à une solution de saline pendant la période d'AAIV est divisé de la même manière en deux sous-groupe au moment du traitement chronique avec l'URB. Un sous-groupe de rats reçoit donc l'URB597 à la dose de 0.3mg/kg/jour (Solvant URB, SU, n= 16) alors que l'autre sous-groupe reçoit le solvant (Solvant Solvant, SS, n=16). Pendant le traitement chronique avec l'inhibiteur de la FAAH, les animaux sont testés pour plusieurs composantes comportementales (cf paragraphe II.D). L'ensemble de ces informations vous est présenté dans la figure 25.

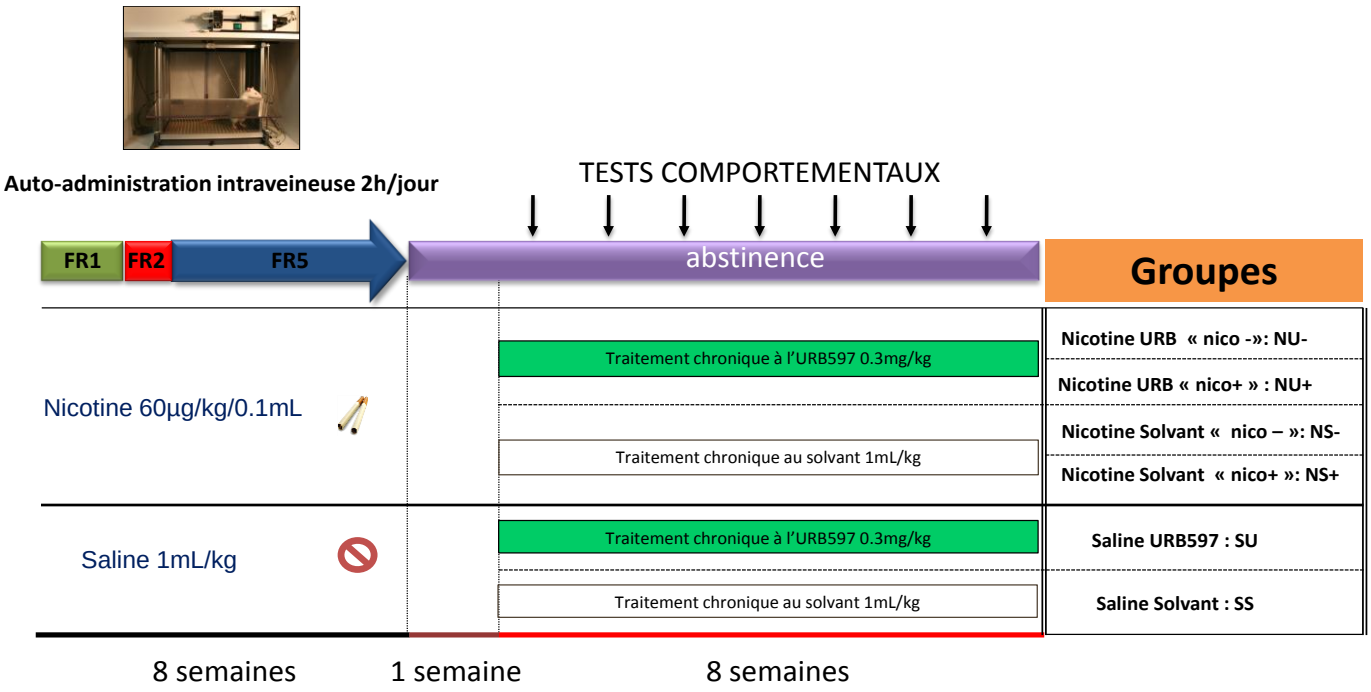


Figure 25 : Histoire pharmacologique des rats exposés à l'AAIV de nicotine

Les animaux sont soumis au protocole d'AAIV de nicotine (n=40) ou de saline (n=32) pendant 8 semaines. Les rats sont ensuite sevrés par arrêt des séances d'AAIV et une semaine après le début du sevrage, commence le traitement chronique à l'URB597 (0.3mg/kg) ou au solvant. Lors de l'analyse des résultats, nous avons séparé les rats ayant consommés de fortes quantités de nicotine et ceux ayant consommés de faibles quantités.

II.B. Effet du sevrage de la nicotine

Après 8 semaines d'AAIV, les animaux sont sevrés par arrêt des séances et ils resteront abstinents durant tout le reste de l'expérience. Au cours de la première semaine de sevrage, l'état d'anhédonie et les troubles de l'activité générale circadienne sont mesurés.

II.C. Mesure des propriétés incitatives de la nicotine et des stimuli associés à la prise de nicotine dans le comportement de recherche de nicotine chez le rat abstinent à long terme.

Après 8 semaines d'abstinence, nous avons mesuré l'effet de l'inhibition chronique de l'enzyme de dégradation de l'AEA sur la motivation persistante pour la nicotine, qui est

responsable de la rechute. Cette motivation s'exprime part la répétition compulsive du comportement opérant pour obtenir la nicotine (visite du trou actif) malgré l'absence de drogue délivrée. Les animaux sont replacés dans les cages d'auto-administration et mis en présence de 2 facteurs précipitants différents : i) la réexposition à la drogue immédiatement avant de replacer le rat dans la cage opérante (nicotine, 0.3mg/kg sc.) et ii) la présentation du stimulus lumineux précédemment associé à l'infusion de nicotine dès que l'animal est replacé dans la cage opérante.

II.D. Caractérisation du phénotype émotionnel : composantes comportementales et endocriniennes

Les animaux ont été soumis à une batterie de tests comportementaux dont l'ordre a été choisi en fonction de l'intensité du stress engendré par chacun des tests. Les animaux ont réalisé les taches comportementales les moins stressantes dans un premier temps pour éviter une interférence sur le comportement dans le test suivant.

II.D.1. Profil « anxieux »

Trois tests ont été réalisés pour examiner l'effet de l'inhibition chronique de l'enzyme de dégradation de l'AEA sur différentes composantes de l'anxiété des rats abstinents. L'effet du traitement chronique à l'URB597 est testé sur l'anxiété en condition 1) basale dans le test du labyrinthe en croix surélevé, 2) de stress modéré induit par la privation alimentaire dans le test d'hypophagie induite par un environnement nouveau et 3) de stress social dans le test d'interaction sociale.

En outre, nous avons réalisé une vérification pharmacologique de l'implication du récepteur CB1 dans les effets pro-anxieux de l'URB chez les rats abstinents de la nicotine. Pour cela, un nouveau groupe de rats a été exposé à des injections chroniques de nicotine (cf. Matériel et méthodes III. B) jusqu'à ce qu'ils aient reçu des quantités de nicotine comparables à celles consommées pendant les 8 semaines d'AAIV de nicotine. Nous avons donc constitué un groupe « Nicotine » et un groupe « Saline ». Une semaine après la dernière injection, le groupe « Nicotine » a été divisé en deux et un sous-groupe recevant le traitement chronique à l'URB597 à la dose de 0.3mg/kg/jour (NU, n= 16) ou au solvant (NS, n=16). Le groupe « Saline » a été traité avec le solvant (SS n=16) (Figure 26).

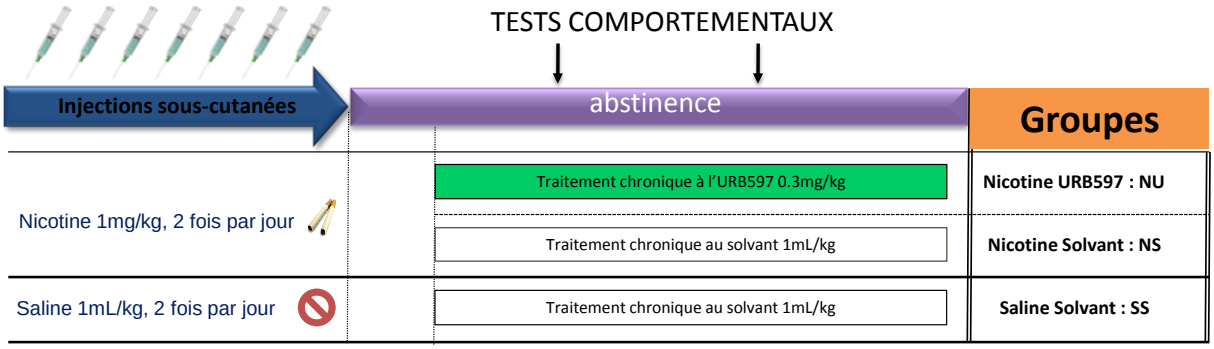


Figure 26 : Histoire pharmacologique des rats traités par injections répétées de nicotine

Les animaux sont traités avec des injections répétées de nicotine (1mg/kg, 2x par jour)(n=32) ou de saline (n=16). Les rats sont ensuite sevrés par arrêt des injections et une semaine après le début du sevrage, commence le traitement chronique à l'URB597 (0.3mg/kg, 1injection/jour) ou au solvant.

La vérification pharmacologique de l'implication du récepteur CB1 dans les effets pro-anxieux de l'URB chez les rats abstinents de la nicotine a été déterminée dans le test du labyrinthe en croix surélevé. Trente minutes avant le test, la moitié de chaque groupe a reçu une injection d'un antagoniste des récepteurs CB1 : l'AM251 à la dose de 1mg/kg et l'autre moitié une injection de solvant. Nous avons choisi la dose de 1mg/kg car il a été montré qu'à cette dose l'AM251 ne modifie pas le comportement des rats naïfs (Haller et al., 2007).

II.D.2. Profil « dépressif »

L'effet de l'inhibition de l'enzyme de dégradation de l'AEA sur le phénotype dépressif des rats abstinents est examiné grâce à 3 tests permettant de mesurer l'occurrence de différents symptômes associés à la dépression. L'effet du traitement chronique à l'URB597 est testé sur : 1) l'état de résignation, modélisé par le test de la nage forcée 2) l'état d'anhédonie mesuré par diminution de la préférence pour une solution sucrée, et 3) les troubles de l'activité générale circadienne renseignée par la mesure de l'activité locomotrice diurne et nocturne.

Nous avons également examiné la spécificité des effets de l'URB597 sur le comportement d'immobilité, c'est-à-dire que nous avons vérifié que l'augmentation du temps d'immobilité n'est pas la conséquence d'une inhibition motrice. Pour cela, nous avons mesuré l'effet du traitement chronique URB597 sur la résistance à l'effort. Les animaux ayant été exposés à des injections chroniques de nicotine et puis d'URB597 ont réalisé le test du tapis roulant électrifié, et leur résistance à l'effort a été mesurée pendant 5 min.

II.D.3. Analyse des marqueurs biologiques

II.D.3.a Mesure de la réponse de l'axe HPA en situation de stress de contention

En fin d'expérience, les niveaux de corticostérone plasmatique sont mesurés en condition basale (t0), avant un épisode de stress de contention de 30 min. Puis la cinétique du retour à l'état basal est déterminée avec des points successifs de collecte à 30, 60 et 120 min.

II.D.3.b Effet du traitement chronique à l'enzyme de dégradation de l'AEA sur les récepteurs CB1

En collaboration avec le Docteur Tiziana Rubino (Université d'Insubria, Italie), nous avons débuté une étude de quantification des récepteurs CB1 dans les structures d'intérêt des cerveaux des rats qui ont subi les expériences présentées dans cette 2è partie. Le principe de cette quantification consiste à mesurer i) la densité des récepteurs par analyse de la capacité de fixation du récepteur à un ligand et ii) la désensibilisation des récepteurs par analyse de la capacité de fixation de la protéine G associée au récepteur CB1 (Rubino et al., 2000).

II.E. Analyses statistiques

Résultats de l'AAIV : l'analyse du nombre de réponses durant l'acquisition est réalisée avec une ANOVA à mesures répétées avec 2 facteurs dépendants : « jours » et « réponses » (2 niveaux : renforcées vs. non renforcées) et avec un facteur indépendant : AAIV (saline vs. nicotine). La discrimination entre les 2 leviers est analysée via une ANOVA à mesures répétées avec 1 facteur dépendant « jours » et 1 facteur indépendant « AAIV » (2 niveaux : saline vs. nicotine).

A la fin de la période d'AAIV, l'analyse de la consommation de nicotine des différents groupes est réalisée en utilisant une analyse de variance paramétrique (ANOVA) à 2 facteurs indépendants : un facteur nicotine (2 niveaux : Nicotine – et Nicotine+) et un facteur URB (2 niveaux : URB597 et Solvant).

Pour les tests comportementaux consécutifs à l'exposition à la drogue, les résultats des groupes « Saline » et « Nicotine » sont analysés séparément car le groupe « Nicotine » est ensuite divisé en 2 sous-groupes.

Pour le groupe « Saline » :

Les expériences à un facteur indépendant (URB vs. Solvant) sont analysées au moyen du t test de Student pour le test d'EPM, de NSF, d'interaction sociale et de la nage forcée.

Pour les expériences à plusieurs facteurs, les analyses statistiques sont réalisées en utilisant une ANOVA à un facteur indépendant : URB (2 niveaux : URB et solvant) et des facteurs dépendants variables en fonction du test :

- pour le test de rechute : un facteur rechute (2 niveaux : extinction et injection de nicotine ou signal lumineux),
- pour le test d'anhédonie et d'activité locomotrice : le facteur test (3 niveaux : avant l'AAIV, Après un jour d'abstinence et après traitement URB)
- pour les dosages de corticostérone : le facteur temps de prélèvement (4 niveaux : T0, T30, T60 et T120).

Pour le groupe « Nicotine » :

Les analyses statistiques sont réalisées en utilisant une ANOVA à deux facteurs indépendants : nicotine (2 niveaux : Nicotine – et Nicotine+) et URB (2 niveaux : URB et solvant), et des facteurs dépendants variables en fonction du test comportemental analysé :

- un facteur dépendant à un niveau dans les tests d'EPM, de NSF, d'interaction sociale et de la nage forcée et d'activité locomotrice.

- un facteur dépendant à plusieurs niveaux :

- pour le test de rechute : un facteur rechute (2 niveaux : extinction et injection de nicotine ou signal lumineux),
- pour le test d'anhédonie, le facteur test (3 niveaux : avant l'AAIV, après un jour d'abstinence et après traitement URB)
- pour les dosages de corticostérone : le facteur temps de prélèvement (4 niveaux : T0, T30, T60 et T120).

Les résultats du test de résistance à l'effort sont analysés par une ANOVA à un facteur indépendant « traitement ».

Pour l'ensemble des résultats présentés :

Les données représentent la moyenne ± SEM.

Les analyses statistiques sont été réalisées par le biais d'une analyse de variance (ANOVA) paramétrique suivie, lorsque nécessaire, par le test *post-hoc* (PLSD de Fisher).

Les analyses statistiques sont significatives dès que la valeur $p<0.05$

Le nombre d'individus utilisés pour chaque expérience est spécifié dans la légende des figures. La différence entre le nombre de rats au départ de l'étude et le nombre de rats inclus dans les analyses statistiques finales s'explique, car 5 rats sont morts au cours de l'expérience et 1 rat a été exclu pour cause de cathéter défaillant.

III. Résultats :

III.A. Consommation volontaire de nicotine.

Les animaux ont été exposés 8 semaines au protocole d'AAIV de nicotine (groupe « Nicotine », n=39) ou d'une solution saline (groupe « Saline », n=32). L'analyse des réponses opérantes [réponses renforcées (RR) et non renforcées(NR)] quand le comportement est stabilisé indique que le comportement d'AAIV des rats « Saline » et « Nicotine » est stable au cours de la semaine [interaction jours x réponses : $F(4,276)=0.45$, p=N.S] (Figure 27). En revanche, les groupes « Saline » et « Nicotine » présentent des taux de discrimination pour le trou actif différents [réponses globales : interaction réponses x AAIV : $F(1,69)=7.437$, $p<0.01$ et discrimination : effet AAIV : $F(1,64)=6.6$, $p<0.01$]. En effet, les analyses post-hoc montrent que le groupe « Nicotine » visite préférentiellement le trou actif (RR=59 visites vs NR=31 visites) [RR vs NR $p<0.0001$] avec une discrimination entre les leviers de 68 %. En revanche, le groupe Saline visite de façon indifférenciée, le trou renforcé (RR=10.3 visites) et le trou non renforcé (NR=8.2 visites) [RR vs NR, p=N.S] et présente un taux de discrimination de 55.6 %.

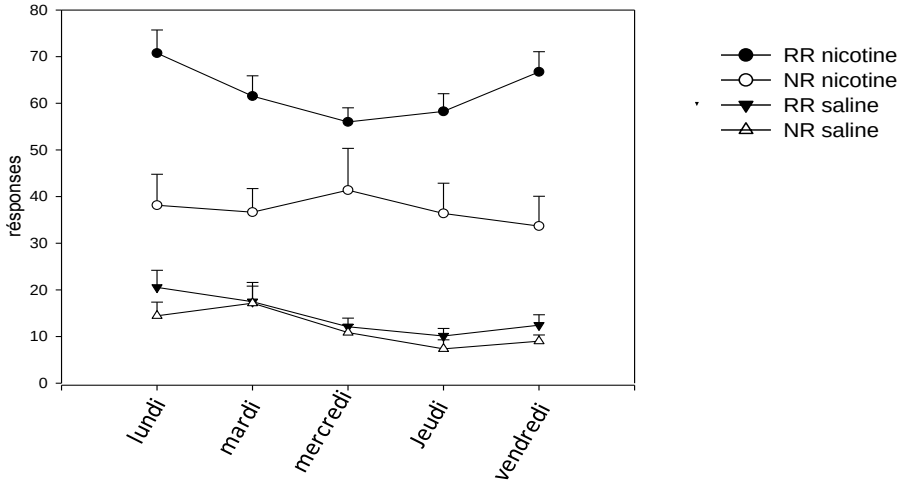


Figure 27 : Représentation d'une semaine de comportement d'auto-administration intraveineuse à FR5 en fin d'exposition. Le nombre de réponses renforcées (RR) (symboles noirs) et non renforcées (NR) (symboles blancs), chez des animaux consommant de la nicotine (60 mg/kg/inf) (cercle) ou une solution saline (triangle). Chaque point représente la moyenne ±sem.

Après la période d'auto-administration, le groupe Nicotine est divisé en deux groupes homogènes en terme de consommation de nicotine consommée, l'un sera traité chroniquement au solvant et l'autre à l'URB597: Nicotine-Saline (NS) et Nicotine-URB (NU) [effet URB : F(1,35)=0.014 p N.S]. Chacun de ces groupes est divisé en deux sous-populations (Nicotine- et Nicotine+) réparties de part et d'autre de la valeur médiane de la quantité totale de nicotine consommée (valeur médiane NS = 36270 µg/kg et NU=36405µg /kg) volontairement au cours de l'exposition chronique à la nicotine. Cette répartition arbitraire nous a donc permis de faire nos analyses sur 4 groupes différenciés par la quantité totale de nicotine consommée : les NS avec une faible consommation de nicotine (**NS-,** n=10, quantité moyenne nicotine : 30726 ±1765 µk/kg base), les NS avec une forte consommation de nicotine (**NS+**, n=9, quantité moyenne nicotine : 44543 ±3361 µk/kg base), les rats NU avec une faible consommation de nicotine (**NU-**, n=10, quantité moyenne nicotine : 28728 ± 1529 µk/kg base) et les rats NU avec une forte consommation de nicotine (**NU+**, n=10, quantité moyenne nicotine : 46029 ± 1529 µk/kg base), notre répartition permet d'observer une quantité de nicotine consommée significativement différente entre les groupes « Nicotine - » et « Nicotine+ » [effet nicotine : F(1,34)=50.3, p<0.0001].

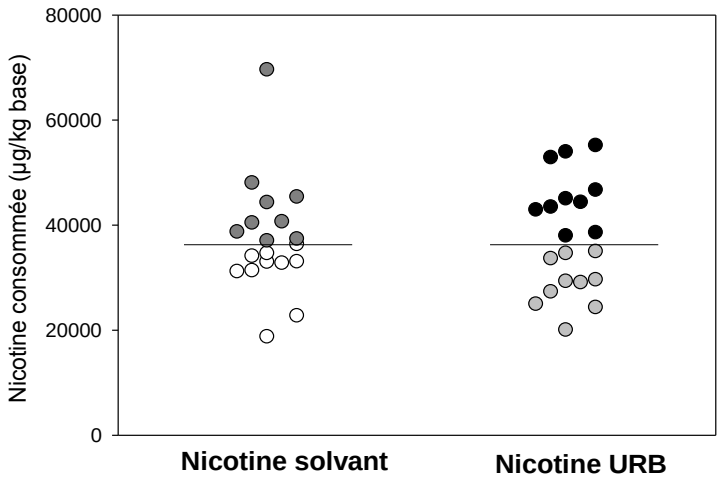


Figure 28 : Consommation totale de nicotine (60µg nicotine base/kg/0.1ml). La quantité de nicotine consommée volontairement par les rats est exprimée en µg nicotine base/kg. A la fin de la période d'auto-administration, les rats sont répartis en deux groupes homogènes en vue de leur traitement pendant la période d'abstinence : un groupe qui recevra l'URB597 (**Nicotine-URB**, NU n=20) et un groupe qui recevra le solvant (**Nicotine-Solvant**, NS n=19). Chacun de ces groupes est divisé en deux sous-population réparties de part et d'autre de la valeur médiane de la quantité totale de nicotine consommée (médiane pour le groupe NS=36270 et NU=36405µg nicotine base/kg). On distingue ainsi 4 groupes : les NS avec une

faible consommation de nicotine (**NS-** en blanc, n=10), les NS avec une forte consommation de nicotine (**NS+** en gris foncé, n=9), les rats NU avec une faible consommation de nicotine (**NU-** en gris clair, n=10) et les rats NU avec une forte consommation de nicotine (**NU+** en noir, n=10).

III.B. L'inhibition chronique de l'enzyme de dégradation de l'AEA diminue la recherche de nicotine chez les rats abstinents

III.B.1. L'URB597 bloque la rechute induite par l'exposition à la nicotine quelle que soit la consommation initiale de nicotine

Pour les rats SS et SU, le trou « actif » ne doit pas avoir acquis de salience positive puisqu'il n'a jamais été renforcé par l'injection de nicotine. De facon surprenate, les résultats indiquent qu'une injection aigue de nicotine administrée immédiatement avant la mise en cage opérante chez ces rats qui n'ont jamais expérimenté la nicotine diminue le nombre de visites du trou renforcé [effet rechute : $F(1,28)=6.89$, $p<0.05$]. Cette inhibition de la réponse est observée tant chez les SS que les rats SU [interaction rechute x URB597 : $F(1,28)=0.27$ p N.S].

Pour les rats « Nicotine » : après 8 semaines d'abstinence, l'injection aiguë de nicotine administrée immédiatement avant la mise en cage opérante augmente le nombre de visites du trou actif, par rapport à la séance d'extinction [effet rechute : $F(1,32)=15.726$, $p<0.0001$]. De façon intéressante, le traitement chronique à l'URB597 bloque la rechute induite par l'injection de nicotine [interaction rechute x URB597 : $F(1,32)= 4.09$, $p<0.05$] indépendamment de la quantité de nicotine consommée au cours de l'AAIV [interaction rechute x nicotine x URB : $F(1,32)=0.29$, $p=0.58$ N.S] (Figure 29). Les analyses post-hoc montrent que chez les rats Nicotine-Solvant l'administration de nicotine augmente le nombre de visites du trou actif ($RR = 14.6 \pm 4.7$) par rapport à la séance d'extinction ($RR\ extinction = 2.25 \pm 1.2$) [RR du groupe NS : extinction vs injection nicotine, $p<0.001$]. Cet effet est bloqué par le traitement chronique à l'URB597, car pour les rats Nicotine-URB, le nombre de visites après injection de nicotine ($RR = 7.2 \pm 3.6$) ou en condition d'extinction ($RR\ extinction= 3.3\pm2.01$) n'est pas significativement différent [RR du groupe NU : extinction vs injection nicotine, p N.S]

Dans le groupe NS, la moyenne du nombre de visites du trou actif après injection de nicotine est la même quelle que soit la quantité de nicotine précédemment consommée (RR

injection nicotine : NS- = 11.8 ± 4.1 et NS+ = 17 ± 8.3). Le traitement URB597 diminue le comportement de recherche de nicotine de la même manière quelle que soit la quantité de nicotine consommée (RR injection nicotine : NU- = 5.5 ± 2.6 et NS+ = 8.9 ± 3).

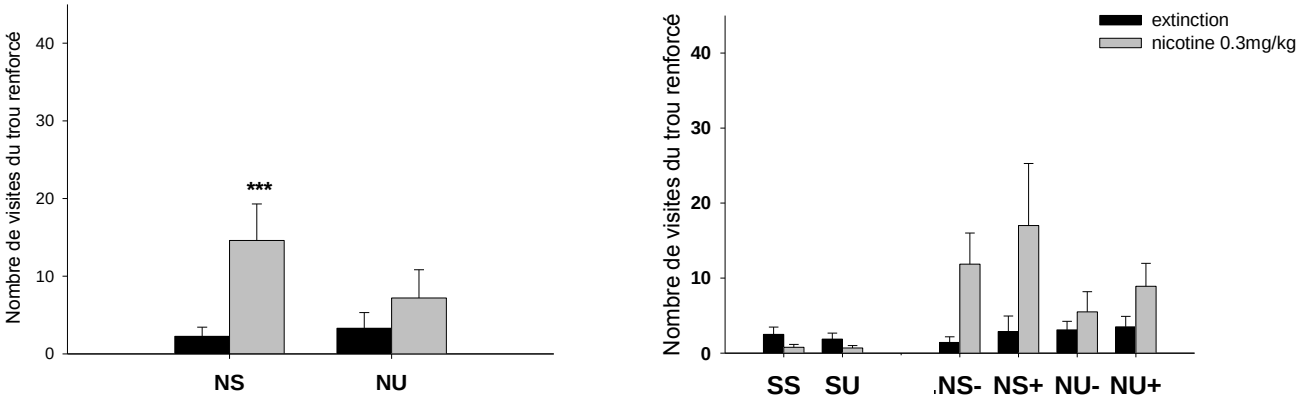


Figure 29 : **Effet de l'inhibition chronique de l'enzyme de dégradation de l'AEA sur les propriétés incitatives de la nicotine chez les rats abstinents. a et b)** Rechute induite par une injection de nicotine (0.3 mg/kg sc). Nombre de visites du trou « actif » sur 30 min. Les histogrammes noirs représentent les visites au cours de la période d'extinction alors que les histogrammes gris représentent les visites au cours de la séance test. (NS- n=7, NS+ n=9, NU- n=10 et NU+ n=10). La valeur représentée pour chaque groupe est la moyenne ±sem. *** p<0.001, par rapport à la séance d'extinction.

III.B.2. L'URB597 diminue la rechute induite par la présentation du stimulus associé à la prise de nicotine

Les résultats du test de rechute induite pas la présentation du stimulus lumineux immédiatement à l'introduction dans la cage, puis ensuite à chaque visite du trou « actif », montre que ce stimulus n'a aucune valeur incitative pour tous les rats « saline » [effet rechute : $F(1,28)=1.4$, p N.S]. Qu'ils soient traités à l'URB ou non ne rend pas les animaux plus motivés par le trou « actif » et la présentation du stimulus [interaction rechute x URB : $F(1,28)=0.09$, p N.S].

Pour les rats « Nicotine » : après deux mois d'abstinence, la présentation d'un stimulus lumineux lors de la visites du trou précédemment renforcé augmente le nombre de visites de ce trou par rapport à une séance d'extinction [effet rechute : $F(1,32) =33.5$, $p<0.001$]. Dans ces conditions, le traitement chronique à l'URB597 diminue la rechute induite par la

présentation du signal lumineux [interaction rechute x URB597 : $F(1,32)=3.9$, $p<0.05$] quelque soit la quantité de nicotine précédemment consommée par les animaux [interaction rechute x nicotine x URB : $F(1,32)=0.98$, $p= 0.3$ N.S]. Les analyses post-hoc montrent que la présentation du signal lumineux entraine la rechute chez les rats Nicotine-Saline (RR extinction = 2.25 ± 1.18 et RR signal lumineux =29.25 ± 7.2) [RR du groupe NS : extinction vs signale lumineux, $p<0.001$] et chez les rats Nicotine-URB (RR extinction = 3.3± 2 et RR signal lumineux =16.5 ± 3.6) [RR du groupe NU : extinction vs signal lumineux, $p<0.01$]. Bien que la rechute ne soit pas bloquée par le traitement chronique à l'URB597, elle est diminuée par rapport aux rats traités au solvant (NS) [RR pour le signal lumineux : NU vs NS, $p<0.05$]. De plus, cette diminution est spécifique et n'affecte pas les réponses en condition d'extinction [RR extinction : NU vs NS, p N.S].

Dans le groupe NS, la moyenne du nombre de visites du trou actif en présence du stimulus lumineux est la même quelle que soit la quantité de nicotine précédemment consommée (RR signal lumineux : NS- = 28.7±8 et NS+ = 29.6±11.6). En revanche, dans le groupe NU, l'URB diminue plus fortement le nombre de visites des rats NU- et affecte moins le comportement des rats NU+ (RR signal lumineux NU- = 9.7 ± 3.3et NU+ = 23.4±5.8).

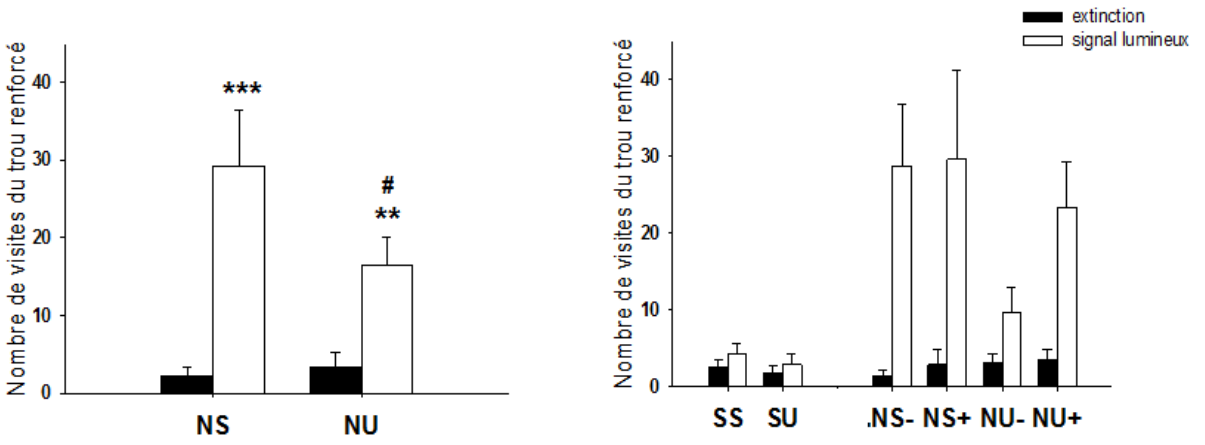


Figure 30 : Effet de l'inhibition chronique de l'enzyme de dégradation de l'AEA sur les propriétés incitatives du stimulus précedemment associé à la prise de nicotine chez les rats abstinents. a) et b) Nombre de visites du trou « actif » sur 30 min. Les histogrammes noirs représentent les visites au cours de la période d'extinction alors que les histogrammes blancs représentent les visites au cours de la séance test. (NS- n=7, NS+ n=9, NU- n=10 et NU+ n=10). La valeur représentée pour chaque groupe est la moyenne ±sem. *** $p<0.001$, ** $p<0.01$, par rapport à la séance d'extinction et #$p<0.05$ par rapport au groupe NS.

III.C. L'inhibition chronique de l'enzyme de dégradation de l'AEA induit un état d'anxiété chez les rats abstinents ayant eu une forte consommation de nicotine

III.C.1. Mesure de l'anxiété en condition basale

Dans le test de labyrinthe en croix surélevé, les rats SS passent 15.4% du temps total dans les bras ouverts et font 24.5 % d'entrées dans ces bras. Les rats SU passent 20.8% du temps total dans les bras ouverts et font 31.6 % d'entrées dans ces bras. La comparaison des données du groupe SS avec les données du groupe SU montrent que le traitement chronique avec l'URB ne produit pas d'effet anxiolytique chez les rats naïfs. En effet, il n'y a pas de différence significative pour le % de temps passé dans les bras ouverts (BO) [t test SS vs SU : t = -1.37, p= 0.18 N.S], ni pour le % d'entrées BO [t test SS vs SU : t =-1.58, p= 0.1 3N.S].

En revanche, le traitement URB597 augmente l'état d'anxiété observé pour le % d'entrées BO chez les rats abstinents de la nicotine [effet URB : $F(1,35)= 4.07$, $p<0.05$] (figure 31.b) et le % de temps passé BO [effet URB : $F(1,35)= 5.06$, $p<0.05$] (figure 31.a). Le traitement URB597 augmente le % de temps passé dans les bras fermés [effet URB : $F(1,35)= 4.78$, $p<0.05$] (figure 31.c). De plus, la consommation antérieure de nicotine des rats abstinents induit des différences significatives que ce soit pour le % d'entrées BO [interaction nicotine x URB : $F(1,35)= 4.70$, $p<0.05$] ou le % de temps passé BO [interaction nicotine x URB : $F(1,35)=3.89$, $p<0.05$]. Les analyses post-hoc montrent qu'au sein du groupe NS, la quantité de nicotine consommée n'influence pas significativement le % de temps passé BO (NS-=16.3±3.4 et NS+=24.5±3.9, NS- vs NS+, p=0.12 N.S). L'expérience d'une forte consommation de nicotine a toutefois tendance à augmenter le % d'entrées BO (NS-=25.6 ± 4.7% et NS+=36.8±3.4%, NS- vs NS+, p= 0.06). Au sein du groupe NU la quantité de nicotine consommée ne modifie pas le % temps passé BO (NU- = 16.1±4.6 et NU+ = 9.8±2.6, NU- vs NU+, p = 0.23, N.S) ni le % d'entrées BO (NU- = 25.3±4.3 et NU+ =18.5±3.9, NU- vs NU+, p=0.25, N.S).

Chez les rats ayant eu une faible consommation de nicotine, le traitement chronique à l'URB597 ne modifie pas le % de temps BO (NS- = 16.3± 3.4 % et NU-=16.1±4.6 %, p N.S.), ni le % d'entrées BO (NS-=25.6±4.7 et NU- =25.3±4.3, p N.S.). En revanche, le traitement chronique à l'URB597 chez les rats abstinents ayant eu une forte consommation de nicotine entraine l'émergence d'un état très anxieux chez les rats NU+ qui se traduit par un plus faible % de temps BO (NS+=24.5±3.9 vs. NU+=9.8±2.6) [PLSD de Fisher : NU+ vs NS+ $p<0.01$] et

un plus petit % d'entrées BO (NS+=36.8±3.4 vs. NU+ =18.5±3.9) [PLSD de Fisher : NU+ vs NS+p<0.01].

Enfin, les effets observés ne sont pas imputables à une différence de comportement exploratoire ou même à une différence d'activité locomotrice puisque le traitement URB597 ne modifie pas le nombre total d'entrées dans les bras ouverts et fermés [interaction nicotine x URB : F(1,35)=0.46, p= N.S] (figure 31.d).

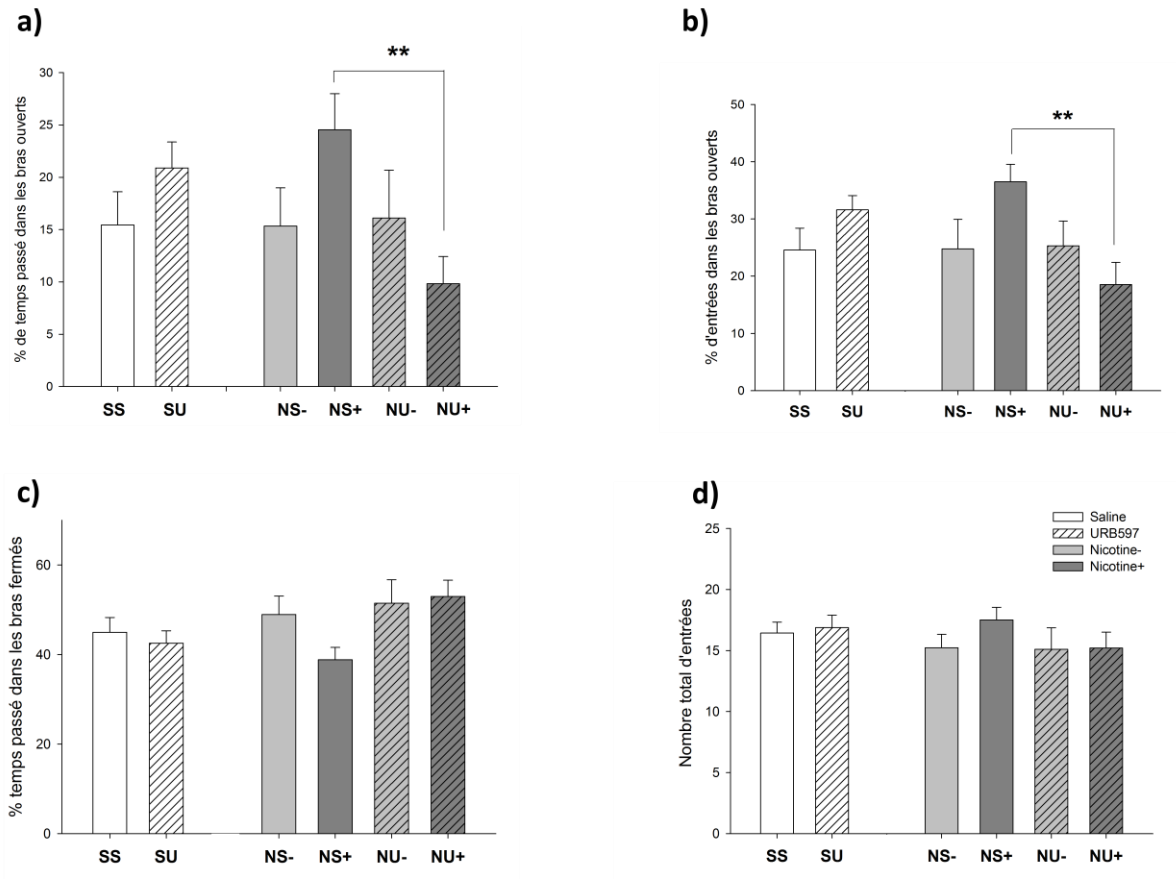


Figure 31 : Effet de l'inhibition chronique de l'enzyme de dégradation de l'AEA sur l'état d'anxiété des rats abstinents dans le test de labyrinthe en croix surélevé sur : a) le pourcentage de temps passé dans les bras, b) le pourcentage d'entrées dans les bras ouverts c) le pourcentage de temps passé dans les bras fermés et d) le nombre total d'entrées dans les bras ouverts et les bars fermés. A gauche, les rats témoins traités avec l'URB597 (SU n=16) ou son solvant (SS n=14). A droite, les rats ayant été exposés à l'auto-administration de nicotine et traités à l'URB597 ou son solvant et répartis en fonction de leur consommation de nicotine (NS- n=9, NS+ n=10, NU- n=10, NU+ n=10). Chaque histogramme représente la valeur moyenne ± sem. ****** p<0.01 NS+ vs NU+.

III.C.2. Mesure de l'anxiété suite à un stress modéré

III.C.2.a Hyphophagie induite par la nouveauté

Les poids des rats après 24h de privation alimentaire sont présentés sur la figure 32 a. Les rats SS et SU répondent de la même façon à la privation alimentaire ponctuelle [perte de poids SS = 33.6 g, SU= 32.8 g ; t=0.31, p N.S]. En revanche, l'analyse de la perte de poids chez les rats abstinents de la nicotine montre que la perte de poids varie en fonction de la quantité totale de nicotine consommée [effet nicotine : $F(1,34)=6.3$, $p<0.01$]. En effet, les animaux qui ont consommé une forte quantité de nicotine perdent moins de poids que les animaux en ayant consommé une faible quantité (perte de poids avant le test groupe **Nicotine-** = 37.4 ± 1.4 g et groupe **Nicotine+** = 31.8 ± 1.6 g). De façon surprenante, le traitement chronique à l'URB ne semble pas amplifier ou diminuer la perte de poids [interaction nicotine x URB : $F(1,34)=$ 0.0.4, p N.S].

Le poids des animaux est également mesuré 24h après le passage dans le test (Figure 31 b). Les rats SS et SU reprennent du poids de façon identique après le test [reprise de poids SS = 41.7 g, SU= 42.7 g ; t= -0.32, p N.S]. En revanche, l'analyse des 4 groupes de rats abstinents de la nicotine montre que la reprise de poids varie en fonction de la quantité totale de nicotine consommée et du traitement reçu. On observe une interaction entre la quantité de nicotine consommée et le traitement URB597 [interaction nicotine x URB : $F(1,34)= 4.5$, $p<0.05$]. Les analyses post-hoc indiquent une tendance des rats NU+ à reprendre moins de poids que les rats NU- [NU- = 47± 3.1 g et NU+ = 38.3 ± 3.2 g, NU- vs NU+, p=0.06].

Les variables qui permettent de mesurer l'état d'anxiété sont la latence à entrer dans la zone centrale de l'arène et la latence à commencer à manger (figure 31 c et d, respectivement).Pour les rat « Salines », le traitement URB597 ne modifie pas la latence pour entrer dans la zone centrale [t test SS vs SU : t=1, p N.S], ni la latence pour commencer à manger [t test SS vs SU : t=0.64, p N.S]. Pour les animaux « Nicotine », le traitement URB597 n'entraine pas de réponse comportementale significativement différente de celle des animaux traités avec le solvant, quelle que soit la quantité de nicotine précédemment consommée : la latence pour aller manger [interaction nicotine x URB : $F(1,34)=0.004$, p N.S] et la latence pour entrer dans la zone centrale [interaction nicotine x URB : $F(1,34)=0.78$, p N.S]. Cependant, on observe un effet nicotine proche de la significativité [effet nicotine : $F(1,34)=3.57$, $p=0.06$] sur la latence avant de commencer à manger. C'est-à-dire que les animaux « Nicotine - » mettent moins de temps avant de commencer à manger (latence

groupe Nicotine - = 137.63 ± 10.8sec) que les animaux « Nicotine + » (latence groupe Nicotine - = 157.63 ± 16.65 sec). Ce résultat est certainement la conséquence de la perte de poids des animaux avant le test, les rats « Nicotine- » ayant perdu plus de poids sont simplement plus motivés pour chercher la nourriture et mettent donc moins de temps avant de commencer à manger que les rats « Nicotine+ ».

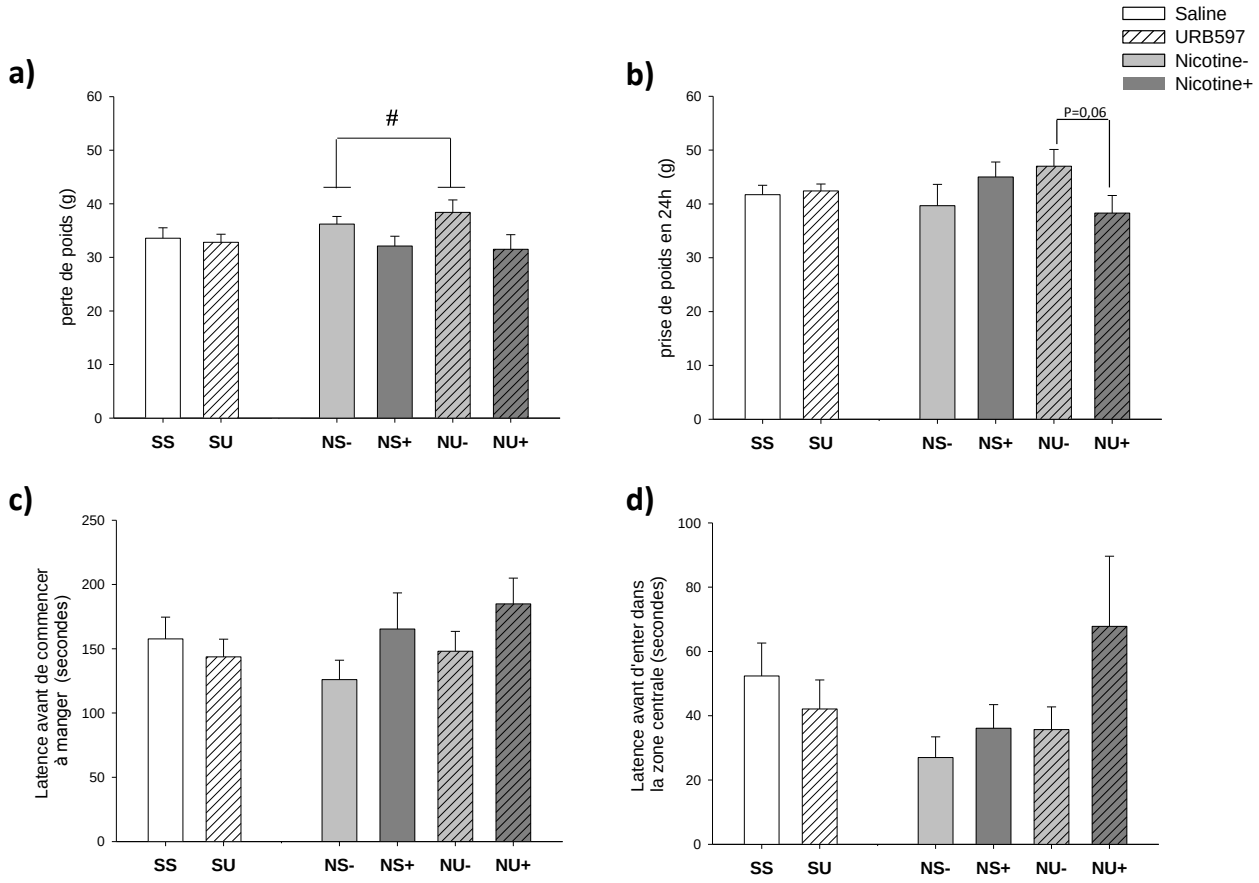


Figure 31 : Effet de l'inhibition chronique de l'enzyme de dégradation de l'AEA sur l'état d'anxiété des rats abstinents dans le test d'hypophagie induite par la nouveauté sur : a) la perte de poids après 24h de privation alimentaire (g), b) la reprise de poids 24 h après le test (g), c) la latence avant de manger la nourriture placée au centre (sec) et d) la latence avant d'entrer dans la zone centrale (sec). Les résultats représentent la moyenne ± sem. #, $p<0.05$ Nicotine- vs Nicotine+.

III.C.2.b Analyses corrélationnelles

L'analyse de corrélation des paramètres mesurés dans les tests du labyrinthe en croix surélevé (EPM) et d'hypophagie induite par la nouveauté (NSF) montre qu'il n'existe pas de

corrélation entre les variables de ces tests pour les rats « Salines » qu'ils soient traités ou non à l'URB.

Pour les rats abstinents de la nicotine traités avec le solvant (NS), quelles que soient les variables comparées, il n'y a pas de corrélation entre les résultats des deux tests examinant l'anxiété (figure 33 a et c). En revanche, pour les rats abstinents traités avec l'URB597 (NU), l'analyse de corrélation montre que certaines variables semblent covarier (Figure 33 b et d), ces données vous sont présentées ci-après.

D'une part, nous avons fait l'analyse du % de temps BO (EPM) par rapport à la latence avant de commencer à manger (NSF). Chez les rats abstinents de la nicotine traités à l'URB (Figure 33 b), le niveau d'exploration des espaces ouverts exprimé dans l'EPM est lié à celui exprimé dans le NSF. Plus spécifiquement, les données montrent que les rats qui explorent le moins les espaces ouverts dans le test d'EPM sont également ceux qui sont le plus agoraphobes et mettent le plus de temps à aller vers la zone centrale (NU coefficient de corrélation de -0.52, $p<0.05$). L'analyse de corrélation par sous-groupe montre une corrélation significative pour les **NU-** ($c=-0.74$, $p<0.01$) et proche de la significativité pour le groupe **NU+** ($c= -0.59$, $p=0.07$) (2 valeurs extrêmes sont certainement responsables de cette statistique).

D'autre part, nous avons réalisé une analyse de corrélation entre le % d'entrées BO (EPM) et la latence avant de commencer à manger (NSF). Les résultats montrent que ces 2 variables sont également corrélées ($c=-0.74$, $p<0.0001$) (Figure 33.d). Les rats abstinents traités URB qui présentent le plus faible % de temps BO sont ceux qui présentent la latence à manger la plus grande ; et ce, quelle que soit leur histoire de consommation de nicotine (NU- : corrélation=-0.74, $p<0.05$ et NU+ : corrélation=-0.71, $p<0.05$).

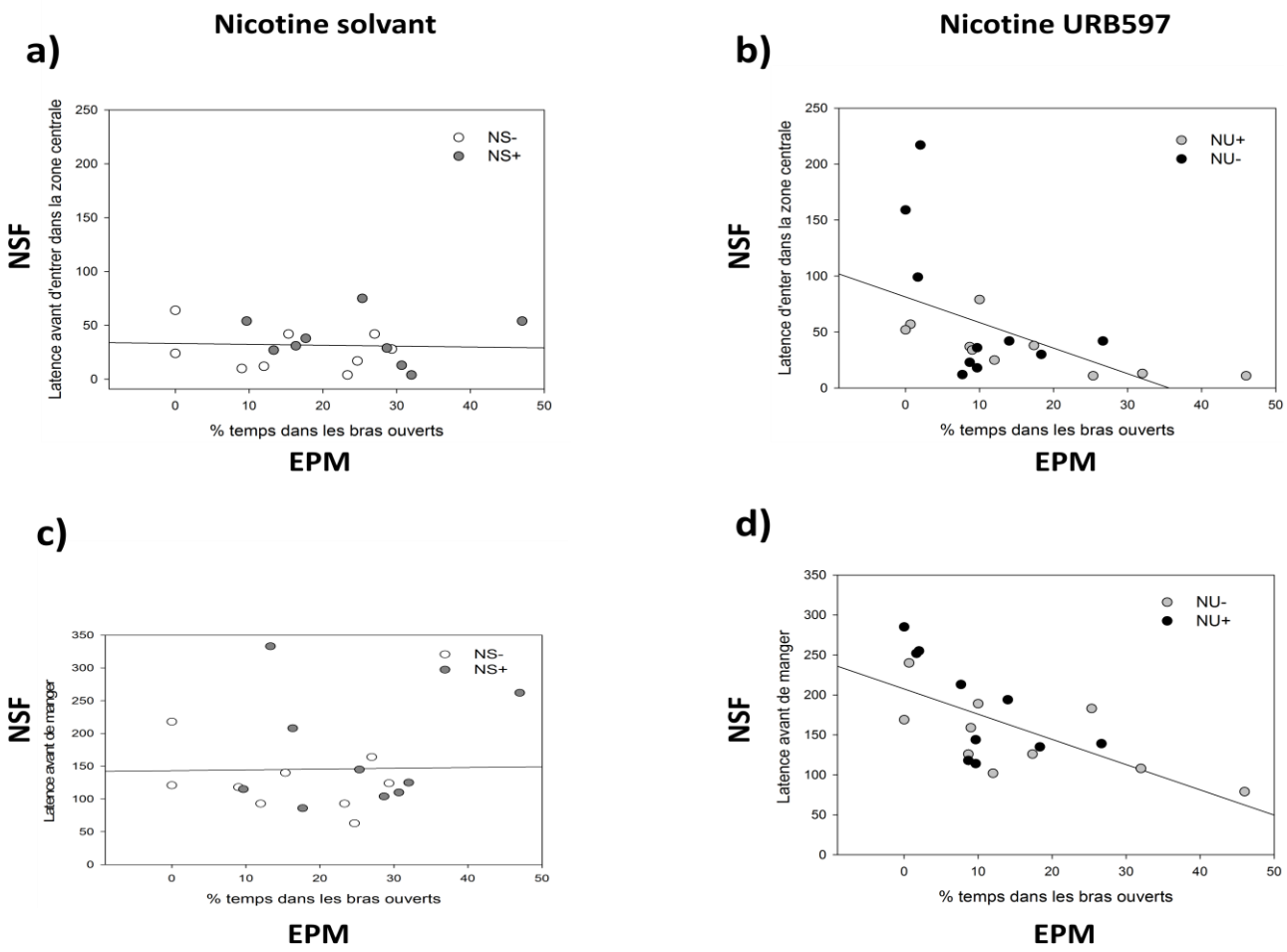


Figure 33 : **Etude de corrélation entre deux tests permettant d'évaluer l'état d'anxiété des rats abstinents. (a et b)** Corrélation entre la latence avant d'entrer la zone centrale (NSF) et le % de temps BO (EPM**); (c et d)** Corrélation entre la latence avant de commencer à manger (NSF) et le % de temps BO (EPM) ; chez les rats NS [NS- (n=9), points blancs ; NS+ (n=9) ; points gris foncés] et les rats NU [NU- (n=10), points gris clairs ; NU+(n=10), point noirs].

III.C.3. Mesure de l'état d'anxiété en condition de stress social

Les animaux naïfs « Saline » présentent le même niveau d'interaction sociale globale qu'ils soient sous traitement chronique à l'URB ou non [t test exploration sociale globale : t=-1.1 p N.S]. Nous avons par ailleurs fait une analyse plus spécifique des différents comportements d'interaction, à savoir l'exploration anogénitale et l'évitement du congénère. Les résultats montrent que le traitement URB ne change pas le comportement d'interaction

sociale quelle que soit la variable considérée [exploration anogénitale : t=-1.4 et évitement : t=1.08, valeurs de p N.S].

Pour les animaux abstinents « Nicotine », le traitement chronique à l'URB ne modifie pas la durée totale d'interaction globale avec le congénère [interaction nicotine x URB : F(1,34)=0.01, p N.S] (Figure 34 a). Cependant l'analyse détaillée de l'intéraction montre que la consommation de nicotine et le traitement à l'URB modifient le comportement d'exploration anogénitale [interaction nicotine x URB : $F(1,34)=6.3$, $p<0.05$] et d'évitement [interaction nicotine x URB : $F(1,34)=4.5$, $p<0.05$] (Figure 34. b et c). Les analyses post-hoc montrent que les rats ayant consommé une faible quantité de nicotine : NS- sont plus anxieux et passent moins de temps dans l'exploration anogénitale (NS- : 107.4 sec ± 12) et plus de temps à éviter le congénère (NS- : 444.5 sec ± 16) que les rats NU- (exploration anogénitale : 156 ± 13 sec ; évitement : 403 ± 15 sec) [PLSD de Fisher : exploration anogénitale : NS-vs NU-, $p<0.01$ et évitement : NS- vs NU- $p<0.05$].

Cependant, l'URB n'est plus anxiolytique lorsque les animaux ont eu une forte consommation de nicotine, les rats NU+ montrent une baisse du temps d'exploration anogénitale (NU+ : interaction anogénitale : 117.3 sec ± 15.5) [PLSD de Fisher NU+ vs NU- $p<0.05$]. Il ressort que le traitement URB est anxiolytique chez les rats abstinents ayant eu la consommation de nicotine la plus basse et induit au contraire un état d'anxiété plus haut chez les animaux ayant eu l'expérience d'une forte consommation de nicotine.

L'analyse de corrélation entre les variables du test d'interaction sociale et les variables des tests précédents (EPM et NSF) ne fait pas ressortir de corrélation.

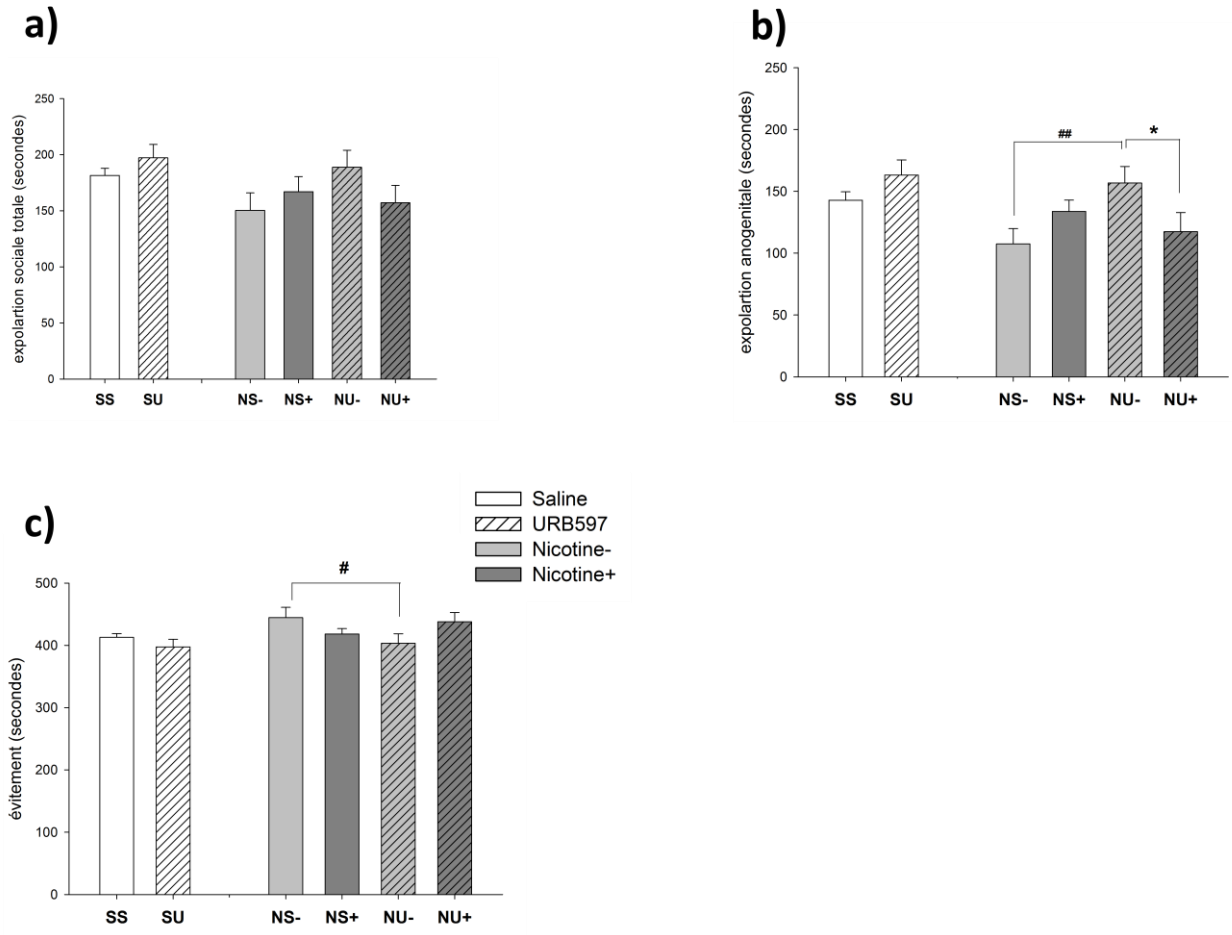


Figure 34 : Effet de l'inhibition chronique de l'enzyme de dégradation de l'AEA sur l'état d'anxiété des rats abstinents dans le test d'interaction sociale sur : a) temps d'exploration sociale globale (sec), b) temps d'exploration anogénitale (sec) et c) temps d'évitement du congénère (sec). Les résultats exprimés représentent la moyenne ± sem. ***** $p<0.05$ vs NU+, ## $p<0.01$, # $p<0.05$ vs NU-**.**

III.C.4. Rôle des récepteurs CB1 dans les effets pro-anxieux induits par l'inhibition de l'enzyme de dégradation de l'AEA chez les rats abstinents

Pour répondre à cette question, nous avons bloqué pharmacologiquement les récepteurs CB1 chez des animaux exposés à de fortes quantités de nicotine, puis traités à l'URB597. Les animaux sont testés dans le modèle du labyrinthe en croix surélevé (Figure 35). Chez les rats « Saline », l'administration d'AM251 ne modifie ni la répartition du temps dans les bras ouverts et les bras fermés, ni l'activité locomotrice générale (Figure 35 a, b, c et d). En effet,

les rats SS passent 20% du temps BO contre 18% pour les rats traités à l'AM251 (SSam) (t test NS vs NS am : t=0.47, p N.S), font 34% des entrées BO contre 36% pour les rats SSam (t test SS vs SSam : t=-0.35, p N.S). Le blocage des récepteurs CB1 ne modifie pas significativement le temps passé dans les bras fermés (t test : t=1.5, p N.S, SS =43 % et SSam= 36%) ni l'activité locomotrice représentée par le nombre d'entrées totales BO+BF (t test : t=0.14, p N.S, SS=18.5 et SSam=18.2).

Chez les rats « Nicotine », les résultats confirment que le traitement chronique à l'URB augmente le comportement anxieux des rats abstinents (Figure 35 a, b, c,). En effet, comme observé précédemment (cf. paragraphe IIIA2), le traitement chronique à l'URB chez les rats abstinents diminue le % de temps BO (NU solvant : 14.4% ± 4.2 et NU am251 : 16.4% ± 2.2 et NS solvant : 23.9% ± 3.7 et NS am251 : 22.9% ± 4.4) [effet URB: $F(1,19)= 5.26$, $p<0.05$]. Cependant le traitement ne modifie pas significativement les autres mesures [% entrées BO : effet URB : $F(1,19) = 2.6$ $p= 0.12$ N.S, % temps dans BF : effet URB : $F(1,19) = 3.4$ $p= 0.08$, p N.S et nombre d'entrées totales : effet URB : $F(1,19) = 0.4$ $p= 0.5$, p N.S]. Par ailleurs, le blocage des récepteurs CB1 par l'AM251 ne modifie aucune des mesures et ne permet pas de bloquer l'effet anxiogène induit par le traitement chronique à l'URB, observé sur le % de temps BO [interaction URB x AM251 : $F(1,19)=0.18$, p N.S].

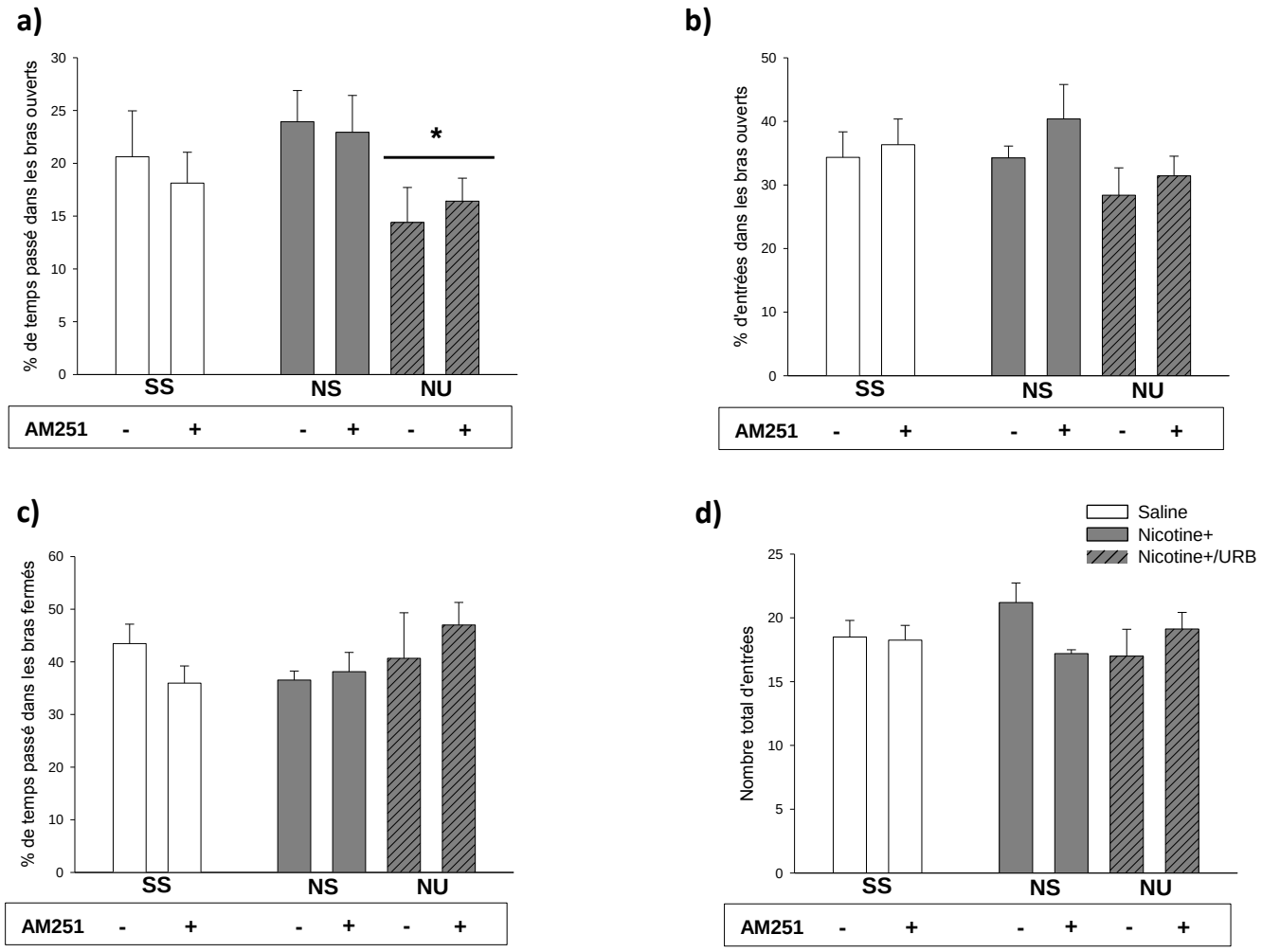


Figure 35 : Effet du blocage des récepteurs CB1 sur l'effet pro-anxieux du traitement à l'URB597 chez les rats abstinents dans le test de labyrinthe en croix surélevé. a) % de temps passé BO, b) % d'entrées BO, c) % de temps passé BF et d) nombre total d'entrées BO et BF Les résultats représentent la moyenne ± sem. ***** p<0.01 NU vs NS.

III.D. <u>Effet de l'inhibition chronique de l'enzyme de dégradation de l'AEA sur les différentes composantes comportementales d'un état dépressif</u>

III.D.1. <u>Mesure de l'état de résignation :</u>

Dans le test de la nage forcée, le traitement chronique à l'URB597 sur les rats naïfs « Saline » ne modifie pas le temps d'immobilité (temps immobilité SS : 106.5 sec et SU : 107.6 sec) (t test SU vs SS t=-0.04, p=N.S).

Chez les animaux « Nicotine », le temps d'immobilité est augmenté chez les animaux traités de façon chronique à l'URB597 [effet URB : $F(1,33)=8.46$, $p<0.01$] indépendamment de la quantité de nicotine précédemment consommée [interaction nicotine x URB : $F(1,33)=0.16$, p N.S] (temps immobilité NS- : 66.6 ± 18.4 sec, NS+ : 90 ± 19.5sec, NU- : 142.7 ± 28.3 sec et NU+ : 147 ± 21.2 sec).

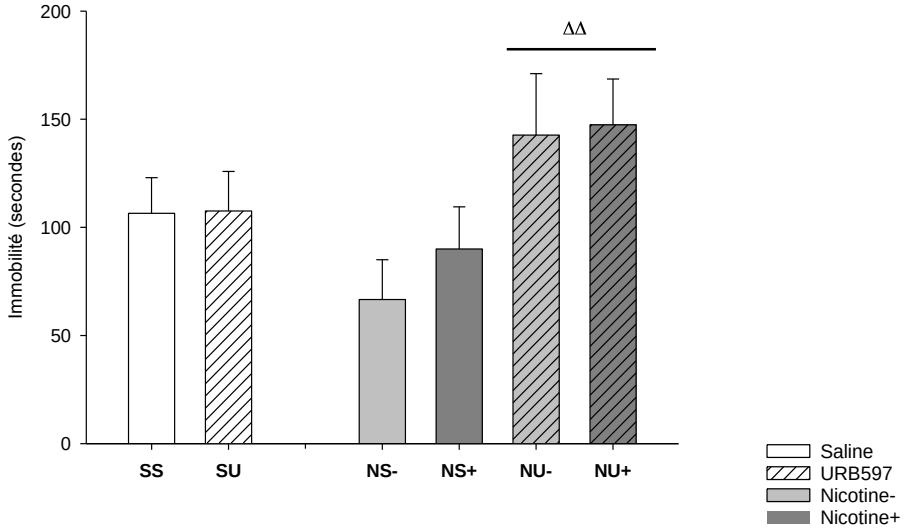


Figure 36 : Effet de l'inhibition chronique de l'enzyme de dégradation de l'AEA chez des rats abstinents dans le test de la nage forcée. Les histogrammes présentent le temps d'immobilité (sec), valeur moyenne ± sem. A gauche, les rats témoins traités avec l'URB597 (SU n=16) ou son solvant (SS n=14). A droite, les rats ayant été exposés à l'auto-administration de nicotine et traités à l'URB597 ou son solvant et répartis en fonction de leur consommation de nicotine (NS- n=8, NS+ n=9, NU- n=10, NU+ n=10). Δ Δ $p<0.01$ vs NS.

III.D.2. <u>Mesure de l'anhédonie :</u>

<u>Effet de l'abstinence à la nicotine sur l'état d'anhédonie</u>

L'expérience de l'AAIV de nicotine, quelque soit la quantité consommée, ne modifie pas de manière significative la quantité de sucrose consommé après un jour d'abstinence [$F(2,64)=2.2$, $p=0.1$ N.S](Figure 37 a). Cependant les groupes présentent un % de préférence pour la solution sucrée différent [$F(2,64)=3.91$, $p<0.05$] (Figure 37 b). Les analyses *post-hoc* révèlent que les rats « Nicotine - » présentent une préférence plus marquée pour le sucrose (Nico- : 80.3% ± 2.2) que les rats « Nicotine+ » (69.5% ± 3) et Saline (72% ± 3.2) [PLSD de Fisher : Nico – vs Nico +, $p <0.01$ et Nico- vs Saline, $p<0.05$].

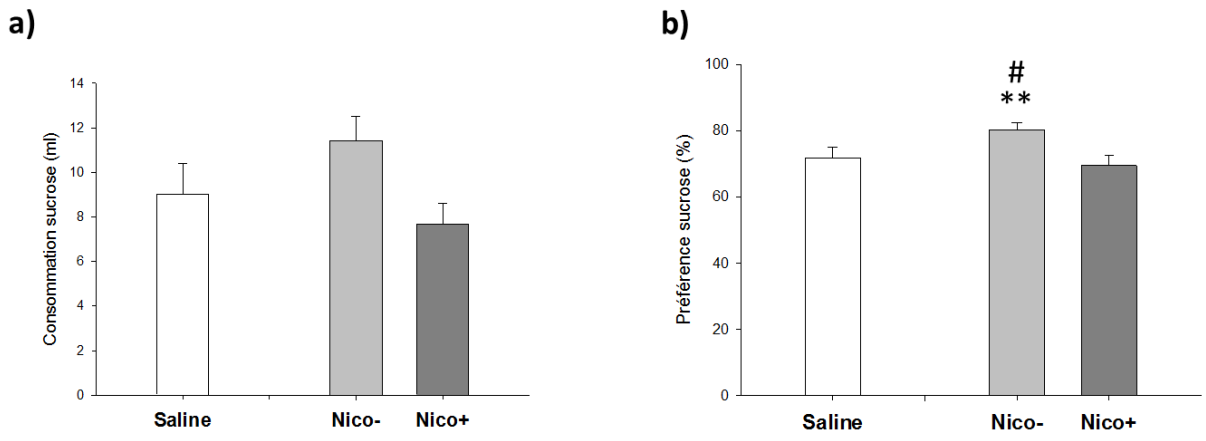


Figure 37 : Effet du sevrage de la nicotine sur l'anhédonie. a) La consommation de sucrose (en ml) et **b)** le pourcentage de préférence pour la solution sucrée par rapport à l'eau sont mesurés un jour après la dernière séance d'auto-administration (NS- n=9, NS+ n=8, NU- n=10, NU+ n=10). Les résultats exprimés représentent la moyenne des groupes ± sem. **p<0.01 Nico-vs Nico+ et # p<0.05 Nico- vs Saline

Effet du traitement chronique à l'URB597 sur l'état d'anhédonie

Chez les rats naïfs, le traitement chronique à l'URB597 ne modifie ni la consommation(t test SS vs SU t=-0.1, p N.S), ni la préférence pour le sucrose (t test SS vs SU t=-0.76, p N.S)

Chez les rats abstinents de la nicotine, les rats ne montrent pas de différence significative en terme de quantité de sucrose consommée quel que soit leur traitement [interaction nicotine x URB : F(1,33)=2.83, p N.S, effet URB : F(1,33)=0.9, p N.S et effet Nicotine ; F(1,33)=0.6 p N.S] (Figure 38 a). L'analyse de la préférence pour le sucrose montre une interaction entre l'effet de l'exposition à l'AAIV et le traitement proche de la significativité [interaction nicotine x URB : F(1,33)=3.63, p=0.066]. Cette interaction suggére que les rats NS- expriment une plus faible préférence pour le sucrose (64% ± 7.8) que les rats NS+ (76.3% ± 2.6), NU- (78% ±3) et NU+ (76.5%±3.8) (Figure 38 b).

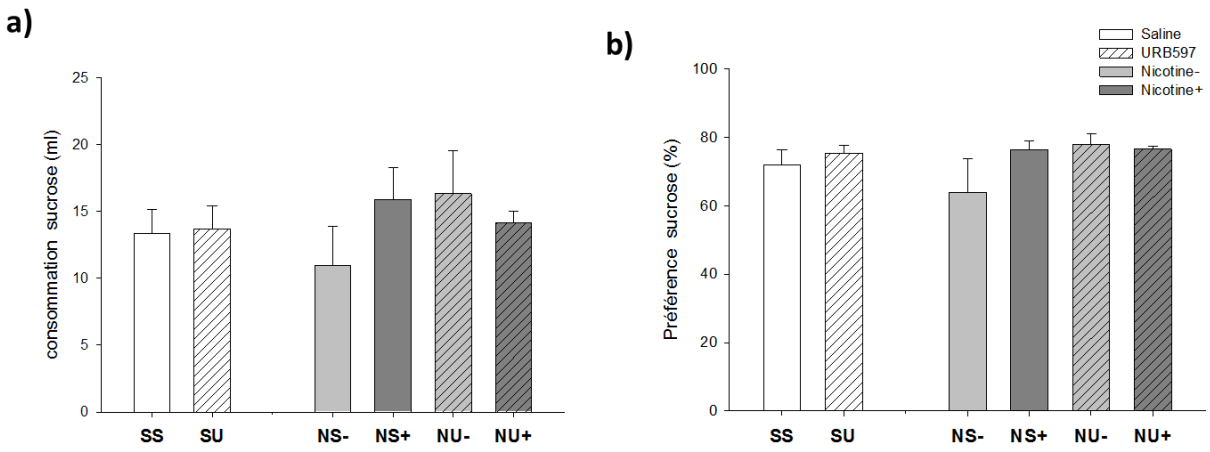


Figure 38 : Effet de l'exposition à la nicotine et de l'inhibition chronique de l'enzyme de dégradation de l'AEA sur l'anhédonie.

a) La consommation de sucrose (en ml) et **b)** le pourcentage de préférence pour la solution sucrée par rapport à l'eau sont mesurés après le traitement chronique à l'URB597 (NS- n=9, NS+ n=8, NU- n=10, NU+ n=10). Les résultats exprimés représentent la moyenne des groupes ± sem.

III.D.3. Mesure de l'activité locomotrice

Analyse après un jour d'abstinence : l'activité locomotrice des rats exposés à l'AAIV de nicotine et de saline a été mesurée un jour après la dernière séance d'AAIV (Figure 39).

L'analyse de l'activité nycthémérale révéle une hyperactivité locomotrice du groupe Nicotine- [$F(2,62)=3.1$, $p<0.5$, PLSD de Fisher : Nico- vs Saline, $p<0.05$ et Nico- vs Nico+ $p<0.05$]. L'activité locomotrice diurne et nocturne ont ensuite été analysées séparément. L'analyse de l'activité nocturne ne révèle pas de différence entre les groupes [$F(2,62)=1.1$, p N.S]En revanche, l'analyse de l'activité diurne montre une différence significative d'activité entre les groupes [$F(2,62)=5.8$, $p<0.01$] qui révèle une hyperactivité des rats ayant précédemment consommé de faibles quantités de nicotine [PLSD de Fisher, Nico- vs Nico+, $p<0.001$ et Nico- vs Saline, $p<0.01$) et une tendance à l'hypoactivité locomotrice des rats Nico+ comparés aux rats Saline.

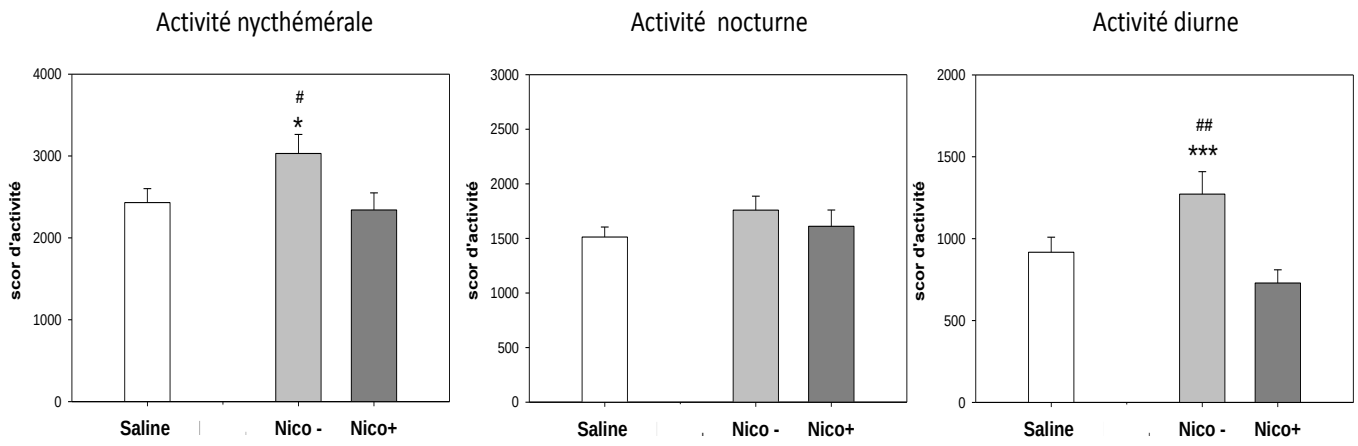


Figure 39 : Effet du sevrage nicotinique sur l'activité locomotrice

Mesure de l'activité locomotrice nycthémérale, nocturne et diurne un jour après la dernière séance d'AAIV, pour les groupes Saline (n=30, en blanc), Nico- (n=19, en gris clair), Nico+ (n=20, en gris foncé). Les histogrammes représentent la moyenne ± sem. ***p<0.001, ** p<0.01 Nico- vs Nico+ et ## p<0.01, # p<0.05 Nico- vs Saline.

Analyse après traitement chronique à l'URB chez les rats abstinents : Chez les rats naïfs, le traitement chronique à l'URB597 ne modifie ni l'activité locomotrice nycthémérale (t test SS vs SU : t=-1.7, p N.S), ni l'activité nocturne (SS vs SU t= -1.8 p N.S) ou diurne (SS vs SU t=-1.2, p N.S). De la même façon pour les groupes « Nicotine », le traitement URB ne modifie pas l'activité nycthémérale, nocturne et diurne, quelle que soit la quantité de nicotine précédemment consommée par les rats [interaction nicotine x URB : pour activité nycthéméral F(1,34)=0.14, p N.S pour l'activité nocturne F(1,34)=0.29, p N.S et pour l'activité diurne F(1,34)=0.0003, p N.S.].

III.D.4. Effet de l'inhibition chronique de l'enzyme de dégradation de l'AEA sur la résistance à l'effort

L'analyse globale des données montrent que quel que soit le traitement considéré, SS ou NS ou NU, tous les rats se comportent de façon identique dans le test du tapis roulant électrifié. En effet, ni l'exposition à la nicotine, ni l'exposition à l'URB ne change la quantité de chocs électriques reçus [durée, F(2,27)=0.37, p N.S ; nombre, F(2,27)=0.45, p N.S et temps moyen d'un choc, F(2,27)=0.72, p N.S].

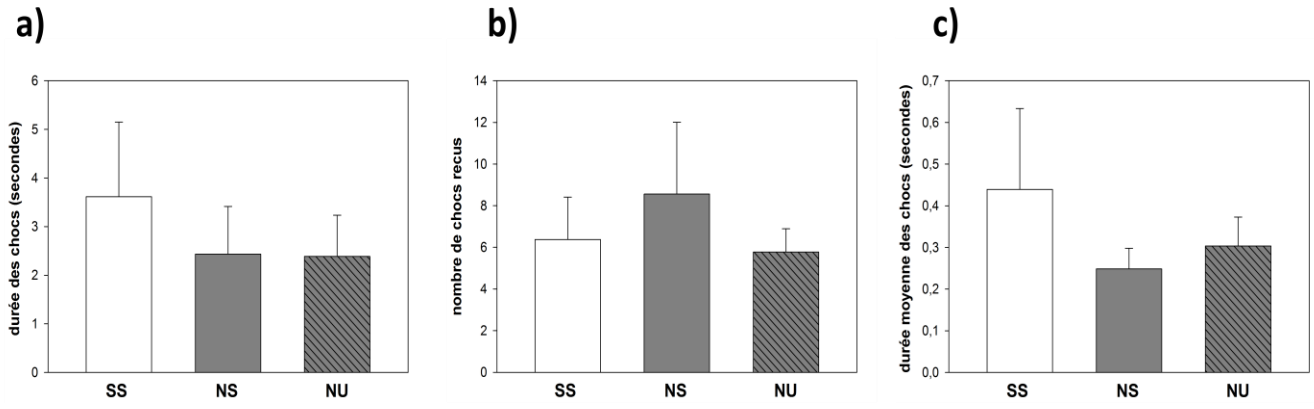


Figure 40: Effet de l'inhibition chronique de l'enzyme de dégradation de l'AEA sur la résistance à l'effort.a) durée des chocs b) le nombre de chocs et c) durée moyenne des chocs reçus par les animaux lorsqu'ils quittent le tapis roulant au cours du test de 5 min (SS n=8, NU n=13, NS n=9). Les résultats représentent la moyenne ± sem

III.E. Analyse des biomarqueurs

III.E.1. Dosage de la corticostérone plasmatique :

La mesure du niveau basal de corticostérone est réalisée à T0 (Figure 41 a T0). Les rats naïfs « Saline » qu'ils soient traités ou non à l'URB597 présentent un niveau basal de corticostérone identique [SS : 70 ± 10 ng/ml et SU : 72 ± 15 ng/ml, t test SS vs SU t=-0.1, p N.S]. De façon similaire pour les animaux « Nicotine », le niveau basal de corticostérone n'est pas différent quel que soit leur traitement [interaction nicotine x URB : F(1,33)=2.1, p N.S] (NS- : 76 ± 13 ng/ml, NS+ : 49 ± 12 ng/ml, NU- : 56 ± 12 ng/ml, NU+ : 66 ± 12 ng/ml).

Après application d'un stress de contention, on observe chez les rats naïfs, une élévation des niveaux de corticostérone circulant [effet temps : $F(3,84)=37.4$, $p<0.0001$]. Ce phénomène n'est pas modifié par le traitement URB [interaction Temps x URB: $F(3,84)=0.57$, p N.S]. L'application d'un stress de contention augmente drastiquement également les niveaux de corticostérone circulant des rats « Nicotine » [effet Temps de prélèvement : $F(3,99)=66.97$, $p<0.0001$]. Les analyses *post-hoc* indiquent que les niveaux de corticostérone augmentent 30 et 60 minutes après le stress [t0 vs t30 $p<0.0001$ et t0 vs t60

p<0.0001] puis reviennent au niveau basal après 120 minutes [t120 vs t0 p=N.S, t120 vs t30 et t120 vs t60 p<0.001] (Figure 41).

En revanche, l'activité de l'axe corticotrope en réponse au stress dépend de l'histoire pharmacologique des rats « Nicotine » [interaction temps de prélèvement x nicotine x URB : F(3,99)=2.68, p<0.05].

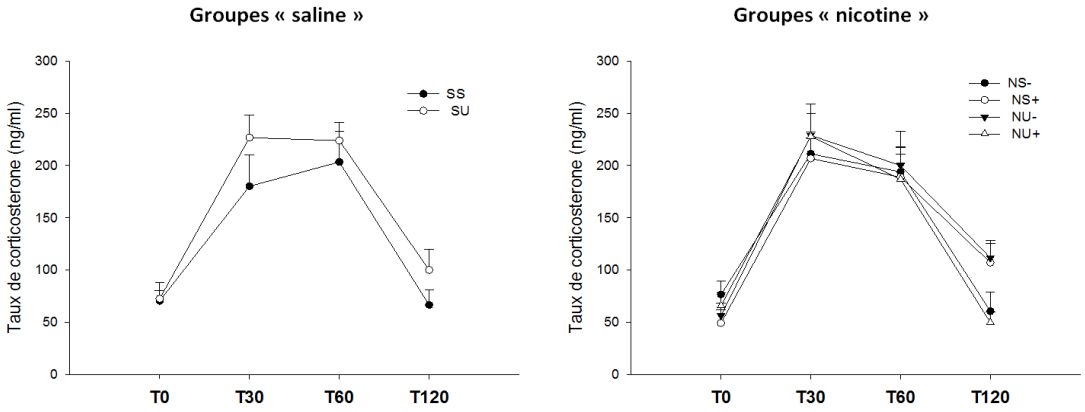


Figure 41 : Cinétique de la réponse de l'axe corticotrope en réponse à un stress de contention chez a) les animaux naïfs et b) chez les animaux abstinents. Les quantités de corticostérone plasmatique sont mesurées à T0 avant le stress de contention, à T30 immédiatement après la contention, puis lors du retour à l'état basal à T60 et T120. Les résultats exprimés représentent la moyenne des groupes ± sem

Les analyses ANOVA aux différents temps de prélèvements indiquent une interaction significative pour les niveaux de corticostérone à 120 minutes [interaction nicotine x URB : F(1,33)=11.59, p<0.001] (Figure 42). Les analyses post hoc révèlent que les groupes NS+ et NU- ont des niveaux de corticostérone plus élevés (taux de corticostérone à T120 : NS+ : 107.1 ± 18.5, NU- : 111.6 ± 16.7) par rapport à NS- et NU+ (taux de corticostérone à T120 : NS- : 60.5 ± 17.9, NU+ : 49.6 ± 10) [NS- vs NU-, p<0.05, NU-vs NU+, p<0.01, NU+ vs NS+, p<0.01]. La comparaison des niveaux de corticostérone T0 et T120 indique qu'à T120, les groupes NS- et NU+ ont retrouvé un niveau de corticostérone identique au niveau basal [t test t0 vs t 120 : NS- : t= 0.8 p N.S et NU+ : t=1.6, p N.S] contrairement aux groupes NS+ et NU- [t test t0 vs t120 : NS+ : t=-2.2, p<0.05 et NU- : t=3.03, p<0.01]. Ces données suggèrent un retour à un niveau basal plus lent pour les groupes NS+ et NU-.

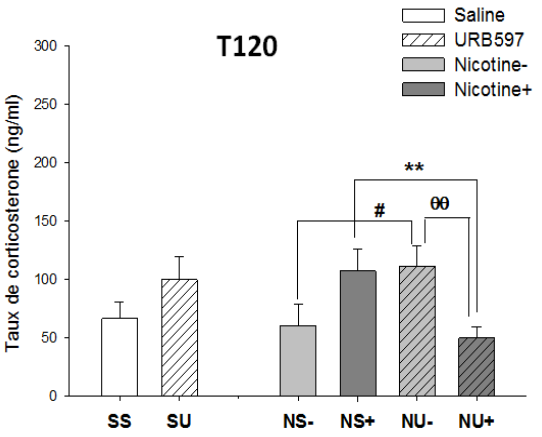


Figure 42 : Taux de corticostérone plasmatique à T120. Les résultats représentent la moyenne ± sem. ** p<0.01 NU+ vs NS+, # p<0.05 NS- vs NU-, 00 p<0.01 NU- vs NU+

III.E.2. Effet du traitement chronique à l'enzyme de dégradation de l'AEA sur les récepteurs CB1

En collaboration avec Dr. Tiziana Rubino (Université d'Insubria, Italie) une étude de quantification des récepteurs CB1 est en cours de réalisation. Ces données devraient nous permettre de déterminer si les différences observées entre les « NS+ » et « NU+ » résultent bien d'une diminution plus importante de la fonction CB1 chez les « NU+ » du fait de l'exposition chronique à l'URB et de déterminer si ces résultats sont dus à une diminution de la densité ou à une désensibilisation des récepteurs CB1 (Rubino et al., 2000).

IV. Conclusions et Discussion

L'analyse globale de nos résultats montre que l'effet de l'augmentation de la disponibilité de l'AEA par l'inhibition chronique de l'enzyme de dégradation de la FAAH dépend de l'historique pharmacologique de l'individu. Ainsi, ce traitement ne produit pas les mêmes effets lorsqu'il est administré à des animaux naïfs ou à des animaux ayant eu l'expérience de la consommation de nicotine, et peut même avoir des effets différents en fonction de la quantité de nicotine consommée.

IV.A. L'AAIV de nicotine : un modèle de consommation volontaire et chronique de nicotine permettant la mise en évidence de variabilités interindividuelles.

Les fumeurs apparaissent comme une population hétérogène quant aux déterminants impliqués dans l'initiation et le maintien de la dépendance (Rezvanfard et al., 2010). Par ailleurs, chez l'homme tous les individus ne sont pas sensibles à la nicotine de la même manière, ce qui se répercute sur leur profil de consommation. Au regard de ces différences, il parait donc nécessaire de développer différentes stratégies tenant compte des spécificités individuelles. Le modèle d'auto-administration intraveineuse de nicotine permet de rendre compte de ces différences. Cependant, tous les individus ne présentent pas la même prédisposition à développer une addiction bien qu'ils soient exposés de la même façon à la drogue (Deroche-Gamonet et al., 2004). Et certains traits comportementaux peuvent prédire la vulnérabilité d'un individu face à une drogue. Par exemple, le trait d'impulsivité est associé avec une plus grande vulnérabilité à développer une addiction pour la cocaïne (Belin et al., 2008; Molander et al., 2010) et à la nicotine (Diergaarde et al., 2008; Diergaarde et al., 2010). Dans notre approche expérimentale, nous n'avons pas identifié les différentes populations à partir de leur vulnérabilité à développer différents critères de l'addiction mais plutôt a partir de leur vulnérabilité aux conséquences à long terme d'une intoxication nicotinique de longue durée.

Dans notre expérience, la ségrégation des populations en fonction de leur consommation de nicotine a permis d'observer une différence en termes de comportement au moment du sevrage et en réponse au traitement chronique à l'inhibiteur de l'enzyme de dégradation

FAAH. L'hétérogénéité de consommation est un élément d'autant plus important qu'il explique peut-être la grande variabilité dans la réponse aux différentes approches thérapeutiques pour le traitement de la dépendance tabagique.

IV.B. L'inhibition chronique de l'enzyme de dégradation de l'AEA : un traitement efficace pour bloquer le rechute à très long terme.

Après 8 semaines d'abstinence, l'administration de nicotine (0.3mg/kg) ou la présentation du stimulus précédemment associé à la prise de nicotine, réinstallent le comportement de recherche de nicotine. Cette rechute témoigne de la motivation persistante des animaux ayant eu une histoire de dépendance pour la nicotine car les mêmes tests sont sans conséquences chez les rats « Saline ».

Par ailleurs, nos résultats indiquent que le traitement chronique à l'URB597 permet de bloquer complètement le comportement de recherche de nicotine induit par l'injection d'une dose de nicotine. L'augmentation chronique de la disponibilité de l'AEA est une approche efficace pour bloquer les effets incitateurs de la nicotine.

De plus, le traitement chronique à l'URB diminue également la recherche de nicotine induite par la présentation du stimulus précédemment associé à la prise de nicotine, même après 8 semaines d'abstinence. Cependant, le niveau de rechute induit par le stimulus lumineux semble déterminé par la prise de nicotine, les rats NU- étant beaucoup moins sensible aux effets incitateurs du stimulus que les rats NU+.

Ces résultats viennent conforter les observations faites après l'administration aiguë d'URB597 (Forget et al., 2009) et désignent l'URB597 comme traitement efficace pour le blocage des propriétés motivationnelles de la nicotine à très long terme.

IV.C. Effet de l'inhibition chronique de l'enzyme de dégradation de l'AEA chez des rats naïfs : pas de modification de l'état émotionnel

Notre étude montre que l'inhibition chronique de l'enzyme de dégradation de l'AEA, ne modifie pas les composantes de la sphère émotionnelle comme l'état d'anxiété et l'état dépressif chez les sujets naïfs. Ainsi dans nos conditions expérimentales, le traitement chronique à l'URB597 ne permet pas de produire un effet anxiolytique et un effet antidépresseur de longue durée. Cependant, bien que le traitement aigu à l'URB597 produise un effet anxiolytique dans la plupart des études (Kathuria et al., 2003; Patel and Hillard, 2006;

Moreira et al., 2008; Rubino et al., 2008a), d'autres travaux montrent au contraire une absence d'effet anxiolytique ou la production d'un effet anxiolytique seulement lorsque les conditions de test sont suffisamment stressantes et permettent la libération d'AEA (Naidu et al., 2007; Moreira et al., 2008; Naderi et al., 2008; Haller et al., 2009). Dans notre étude, on ne peut pas exclure que l'absence d'effet du traitement chronique à l'URB597 sur l'anxiété chez les rats naïfs résulte de conditions expérimentales peu stressantes et donc non propices à l'expression de cet effet. D'autre par, le traitement chronique à l'URB597 ne modifie pas le comportement des animaux dans les tests de mesure de l'anhédonie et de la nage forcée.

IV.D. L'inhibition chronique de l'enzyme de dégradation de l'AEA : un modulateur de la sphère émotionnelle chez les rats abstinents.

IV.D.1. Effet de l'inhibition chronique de l'enzyme de dégradation de l'AEA sur la composante anxiété.

Chez les sujets abstinents de la nicotine, l'inhibition chronique de l'enzyme de dégradation de l'AEA entraine des modifications de l'état émotionnel dépendantes de la quantité de nicotine consommée lors de l'AAIV. En conditions faiblement stressantes dans le test d'EPM, le traitement chronique à l'URB597 augmente l'état d'anxiété chez les rats ayant eu une forte consommation de nicotine (NU+), mais ne modifie pas le comportement des rats ayant eu une faible consommation de nicotine (NU-). En conditions de stress modéré, dans le test de NSF, les résultats sont plus complexes. D'une part, il est très probable que nous observions un biais motivationnel qui vient perturber l'expression de l'état d'anxiété. En effet, les animaux « Nicotine - » qui ont perdu le plus de poids avant le test, sont plus motivés pour aller manger et présentent une plus faible latence que les rats « Nicotine+ ». Cependant, lorsqu'ils sont replacés dans leur cage les rats NU+, plus anxieux, reprennent moins de poids que les autres groupes. Par ailleurs, le traitement chronique à l'URB597 n'altère pas le comportement social des animaux et au contraire induit un effet protecteur sur les rats NU-.

Le traitement chronique avec l'URB597 induit donc un état anxieux chez les rats NU+. De plus, le blocage pharmacologique des récepteurs CB1, lors du test d'EPM dans une deuxième expérience, a permis de démontrer que le mécanisme induisant l'état anxieux chez des rats abstinents ayant eu une forte consommation de nicotine passe par une voie indépendante des récepteurs CB1. Ainsi, si l'effet anxiogène de l'augmentation du tonus AEA chez les rats « Nicotine + » n'est pas sous-tendu par l'activation des récepteurs CB1, il s'agit donc de la

conséquence de l'activation d'une autre voie ciblée par l'AEA, avec comme candidat potentiel le récepteur TRPV1 (Smart and Jerman, 2000). De façon intéressante, des études récentes ont mis en évidence une implication majeure des récepteurs TRPV1 dans la régulation des processus d'anxiété (Kasckow et al., 2004).

IV.D.2. Effet de l'inhibition chronique de l'enzyme de dégradation de l'AEA sur la composante dépression.

L'effet du traitement chronique à l'URB597 sur la composante « dépression » chez les rats abstinents ne fait pas intervenir la variabilité individuelle liée à l'histoire d'imprégnation nicotinique. L'administration chronique d'URB597 exerce un effet « pro-dépresseur » dans le test de la nage forcée sur les animaux abstinents quelle que soit la quantité de nicotine précédemment consommée. Le test de résistance à l'effort réalisé dans la deuxième expérience, nous a permis d'exclure l'hypothèse d'un effet aspécifique du à une diminution de la force musculaire. De façon surprenante, l'administration chronique de la molécule d'URB597 ne modifiepas l'état hédonique, ni l'expression de l'activité locomotrice nycthémérale. Concernant l'état d'anhédonie, nos résultats négatifs peuvent être la conséquence d'un problème de sensibilité du test du fait de la concentration de sucrose choisie, de la souche de rats [comme montré chez la souris, voir (Pothion et al., 2004)] ou même de la mesure de la préférence du sucrose.

IV.D.3. Effet de l'inhibition chronique de l'enzyme de dégradation de l'AEA sur la réactivité de l'axe HPA

En absence de stress, tous les rats présentent des niveaux de corticostérone plasmatique identiques quelle que soit l'histoire pharmacologique des rats. Tous présentent une augmentation rapide de l'activité de l'axe corticotrope avec une augmentation importante des niveaux de corticosterone. Les différences inter-groupes sont révélées au moment du retour à l'état basal de concentration de corticosterone. En effet, alors que les groupes « Saline », NS- et NU+ retrouvent des niveaux comparables à T120, les groupes NS+ et NU- présentent des taux anormalement élevés à T120.

Il est établi que l'exposition à la nicotine augmente l'activité de l'axe corticotrope chez l'homme comme chez le rongeur (Winternitz and Quillen, 1977; Rohleder and Kirschbaum, 2006; Chen et al., 2008). Par ailleurs, il a été montré chez l'homme qu'après un stress les niveaux de cortisol diminuent de la même façon chez le sujet abstinent à très court terme, et

chezble sujet non-abstinent (al'Absi et al., 2002). Cependant, les effets à long terme de l'abstinence sur l'activité de l'axe corticotrope n'ont jamais été étudiés. Notre étude suggère qu'une exposition chronique à la nicotine n'entraine pas de modification de la libération de corticostérone après un stress mais provoque des neuroadaptations qui altèrent les processus de rétrocontrôle sur l'axe. Par ailleurs, du fait d'une histoire pharmacologique différente, le déficit observé chez les NS+ et les NU- implique très certainement des systèmes de neurotransmission différents.

IV.D.4. Conclusion

Tout d'abord, le traitement chronique à l'URB597 diminue chez les rats abstinents les effets incitateurs de la nicotine, quelle que soit la quantité de nicotine préalablement consommée. Ces données suggèrent que l'exposition prolongée entraine des modifications persistantes du SEC dans les structures du système de récompense qui sous-tendent les effets renforçants de la nicotine ; ces modifications peuvent être reversées par le traitement chronique à l'URB597. En revanche, la quantité de nicotine préalablement consommée détermine l'effet pro-anxieux du traitement chronique visant le SEC. Il est intéressant de noter que cette interaction est également déterminante dans la capacité du stimulus associé à la prise de nicotine à précipiter la rechute. Enfin, les effets du traitement chronique avec l'URB597 sur l'état dépressif du rat abstinent varient en fonction du symptôme examiné.

Si le traitement chronique à l'URB597 ne semble donc pas adapté pour les animaux ayant eu une consommation importante de nicotine, il représente cependant une solution thérapeutique intéressante pour la prise en charge de la dépendance tabagique chez des individus ayant eu une consommation modérée de nicotine. En effet, pour ces individus, ce traitement permet de diminuer la rechute sans toutefois induire un état anxieux.

DISCUSSION GÉNÉRALE

I. Rappel des principaux résultats

Récemment identifié, le système endocannabinoïde (SEC) est impliqué dans la régulation de nombreuses fonctions physiologiques, telles que la douleur, les émotions, la prise alimentaire, la motivation et la récompense. Du fait de ces propriétés modulatrices, le SEC est une cible thérapeutique potentielle pour le traitement de la dépendance à la nicotine, molécule addictive du tabac.

Le premier objectif de ma thèse était d'identifier les structures impliquées dans la diminution des propriétés renforçantes de la nicotine par les antagonistes des récepteurs CB1. Nos travaux ont permis de montrer que le contrôle aigu des propriétés renforçantes de la nicotine par les eCB, se faisait principalement via les récepteurs CB1 de l'aire tegmentale ventrale, une des structures centrales du système de récompense.

Le deuxième objectif était de déterminer l'effet chronique d'une augmentation du tonus AEA sur les effets incitatifs à long terme de la nicotine et des stimuli associés. Nos résultats ont d'abord montré une grande variabilité inter-individuelle dans la prise volontaire de nicotine qui a permis de dissocier une population de rats ayant une faible consommation de nicotine « Nicotine- » et une population de rats ayant une forte consommation de nicotine « Nicotine+ ». De plus, nous avons montré que l'inhibition chronique de la FAAH permet de bloquer significativement la rechute induite par la drogue et par les stimuli environnementaux après plusieurs semaines d'abstinence. Cependant, le niveau de rechute induit par les stimuli environnementaux semble déterminé par la prise de nicotine, les rats ayant consommé de faibles quantités de nicotine étant moins sensibles au stimulus. Ces résultats désignent l'URB597 comme traitement efficace pour le blocage des propriétés motivationnelles de la nicotine à très long terme et soulignent l'importance de l'hétérogénéité de la population dépendante à la nicotine dans l'étude de traitements contre l'addiction nicotinique.

Le troisième objectif était de caractériser l'effet de l'augmentation chronique de l'AEA sur le phénotype émotionnel des rats naïfs et des rats abstinents de la nicotine. Nous avons montré que l'augmentation tonique de l'AEA ne modifie pas le phénotype émotionnel des rats naïfs. Cependant, chez les rats abstinents de la nicotine, l'augmentation du tonus AEA provoque un effet anxiogène seulement chez les rats ayant eu une forte consommation de

nicotine, mais pas chez les rats ayant eu une faible consommation. Par ailleurs, nos résultats mettent également en évidence un effet pro-dépresseur du traitement URB597 sur les rats abstinents quelle que soit la consommation antérieure de nicotine.

Enfin, le quatrième objectif de mon travail de thèse était de déterminer l'implication des récepteurs CB1 dans l'effet anxiogène induit par l'augmentation du tonus AEA, observé chez les rats abstinents ayant consommé de fortes quantités de nicotine. Nous avons pu déterminer que l'effet anxiogène induit par l'inhibition chronique de l'enzyme de dégradation de l'AEA était indépendant des récepteurs CB1.

II. ROLE DES ELEMENTS DU SEC

II.A. Le SEC dans l'addiction à la nicotine

II.A.1. Le SEC : un site de modulation des propriétés renforçantes de la nicotine

Les récepteurs CB1 de l'ATV sont des cibles efficaces pour moduler de façon aiguë les propriétés renforçantes de la nicotine chez les rats exposés de façon chronique à la drogue. La balance entre les afférences excitatrices et inhibitrices au niveau de cette structure, module les propriétés renforçantes de la nicotine. Lorsque cette balance est perturbée par l'administration d'un antagoniste nicotinique ou glutamatergique, on observe une diminution des propriétés renforçantes de la nicotine (Corrigall et al., 1994; D'Souza and Markou, 2011). Au niveau de l'ATV, les récepteurs CB1 sont présents sur les afférences excitatrices glutamatergiques et de manière plus dense sur les interneurones inhibiteurs GABAergiques (Melis et al., 2004; Lupica and Riegel, 2005), qui ensemble, modulent l'activité de la voie dopaminergique mésolimbique (Szabo et al., 2002; Melis et al., 2004). D'autre part, des études d'électrophysiologie *in vivo* ont montré que la libération d'eCB par les neurones DA de l'ATV activait les récepteurs CB1 localisés sur les neurones GABA pour produire une suppression de l'inhibition (Lupica and Riegel, 2005) etque l'activation des récepteurs CB1 des neurones glutamatergiques produisait une suppression de l'excitation (Melis et al., 2004; Lupica and Riegel, 2005). Notre travail suggère que les antagonistes CB1, en bloquant l'action des eCB libérés sur les neurones GABA, suite à la stimulation par la nicotine, contribueraient à rétablir la transmission GABA

inhibitrice, et l'inhibition de l'activité des neurones DA responsable des effets renforçants de la nicotine.

La forte densité des afférences glutamatergiques que le BNST envoie vers l'ATV (Georges and Aston-Jones, 2001, 2002), la présence de récepteurs CB1 (Massi et al., 2008) et le développement d'une hyper excitabilité de cette voie glutamatergique spécifiquement chez les animaux à prise volontaire de nicotine (Caille et al., 2009), semblaient désigner le BNST comme une cible privilégiée pour le contrôle des propriétés renforçantes de la nicotine. Cependant, nos résultats démontrent que les récepteurs CB1 du BNST ne suffisent pas pour contrôler la prise de nicotine.

II.A.2. Le SEC : un modulateur à long terme des propriétés incitatives de la nicotine

La stimulation des récepteurs CB1 est un élément fondamental pour le renforcement primaire et pour la motivation persistante pour la nicotine. C'est également un élément important dans le contrôle de la motivation de plusieurs drogues ou même de récompenses naturelles (Wise, 2002). Les récompenses de type drogue ou non drogue ont toutes la particularité de provoquer la libération de dopamine au niveau du Nac et du striatum (Di Chiara and Imperato, 1988; Di Chiara and Bassareo, 2007). Le SEC participe au processus de récompense en facilitant la perception des effets positifs d'un renforçateur via la modulation de la transmission DA mésolimbique (Solinas et al., 2007; Fattore et al., 2010).

Outre les effets renforçants primaires aigus de la nicotine, les récepteurs CB1 sont également impliqués dans les effets motivationnels de la nicotine à long terme. Nous avons montré que chez les rats abstinents de la nicotine, la modulation du SEC diminue les propriétés incitatives de la nicotine après plusieurs semaines d'abstinence. L'augmentation chronique de la disponibilité de l'AEA est une approche efficace pour bloquer les effets incitateurs de la nicotine. Ces résultats viennent conforter les observations faites après l'administration aiguë d'URB597 (Forget et al., 2009) et désignent l'URB597 comme traitement efficace pour le blocage des propriétés motivationnelles de la nicotine à très long terme. Par ailleurs la rechute provoquée par les effets renforçants de la nicotine et la rechute précipitée par la présentation du stimulus lumineux sont sous-tendues par deux voies distinctes (Feltenstein and See, 2008).

La rechute à la nicotine implique plutôt les structures sous-tendant les effets renforçants de la drogue, elle implique les innervations DA du cortex préfrontal médian et du Nac shell en

provenance de l'ATV mais également les projections glutamatergiques du CPF sur le Nac et l'ATV. Cela expliquerait peut être pourquoi dans notre étude, l'inhibition chronique de la FAAH bloque la rechute induite par la nicotine quelle que soit la quantité de nicotine préalablement consommée.

Les structures impliquées dans le mécanisme de rechute induite par la présentation d'un signal lumineux, participent également au contrôle émotionnel chez le rat. En effet, la rechute induite par la présentation d'un stimulus lumineux est sous-tendue par les projections DA de l'ATV sur le BLA, le CPF et le Nac core et par les projections glutamatergiques du CPF et du BLA sur le Nac et du CPF sur l'ATV.

Dans notre étude nous avons constaté une faible diminution de la rechute induite par le signal lumineux après traitement avec l'URB597 des rats ayant consommé de fortes quantités de nicotine, associée avec une plus grande vulnérabilité au stress. Ces résultats semblent donc suggérer un effet délétère de l'augmentation chronique e l'AEA au sein des structures impliquées dans le contrôle des émotions.

II.B. Effet de l'inhibition chronique de l'enzyme de dégradation de l'AEA sur les composantes anxieuse et dépressive des rats abstinents de la nicotine

Si le traitement chronique à l'URB597 ne semble pas adapté pour les fumeurs ayant eu une forte consommation de nicotine, il représente cependant une solution thérapeutique intéressante pour la prise en charge de la dépendance tabagique chez des individus ayant eu une consommation modérée de nicotine ou pour les fumeurs occasionnels (« chippers »). En effet, pour ces individus, ce traitement permet de diminuer la rechute sans toutefois induire un état anxieux.

Nos résultats démontrent dans le test d'EPM que le traitement chronique avec l'URB597 induit un état anxieux chez les rats ayant consommé de fortes quantités de nicotine. L'étude du blocage pharmacologique des récepteurs CB1 lors du test d'EPM a permis de démontrer que le mécanisme induisant l'état anxieux chez ces rats implique une voie indépendante des récepteurs CB1. Ainsi, si l'effet anxiogène de l'augmentation du tonus AEA chez les rats « Nicotine + » n'est pas sous-tendu par l'activation des récepteurs CB1, il s'agit donc de la conséquence de l'activation d'une autre voie ciblée par l'AEA, avec comme candidat potentiel le récepteur TRPV1 (Smart and Jerman, 2000) (cf. paragraphe IIIA ci-dessous).

L'effet du traitement chronique à l'URB597 sur l'état dépressif des rats abstinents ne fait pas intervenir la variabilité individuelle liée à l'histoire d'imprégnation nicotinique. Cela indiquerait donc que c'est l'interaction entre les effets d'une exposition à la nicotine et une exposition à l'inhibiteur qui est responsable de l'augmentation du comportement de résignation. Par ailleurs, des études avec des souris mutées pour le gène du récepteur CB1 spécifiquement dans les populations neuronales GABA ou dans les populations glutamatergiques, ont montré que le comportement d'immobilité dans le test de la nage forcée était sous le contrôle des récepteurs CB1 des neurones glutamatergiques corticaux (Steiner et al., 2008a). D'une part, la prise volontaire de nicotine nécessite l'activation soutenue des afférences glutamatergiques dans l'ATV, et donc une activation soutenue de l'activité DA ; etd'autre parts, les neurones DA de l'ATV présentent des projections corticales. Ainsi, les conséquences à long terme de l'exposition à la nicotine dans le fonctionnement de ce réseau neuronal (sous contrôle tonique des récepteurs CB1), pourraient être responsables du comportement d'immobilité des rats abstinents dans le test de la nage forcée.

II.C. Effet du traitement chronique à l'URB597 sur la fonctionnalité des récepteurs CB1

Il a été montré que l'administration chronique d'un agoniste CB1, le THC entraine une diminution et une désensibilisation des récepteurs CB1 chez l'homme (Villares, 2007) et chez le rongeur (Sim-Selley, 2003; Villares, 2007) à un taux et une amplitude variables en fonction des régions, mais ces modifications affectent surtout l'hippocampe, le noyau caudé putamen et le noyau accumbens. Par ailleurs, le blocage chronique (7 semaines) des récepteurs CB1 par le Rimonabant diminue également la fonctionnalité des récepteurs CB1 dans le Nac et le striatum sans modifier la densité d'expression (Martin-Garcia et al., 2010). Ces observations indiquent donc que l'activation ou l'inhibition chronique des récepteurs CB1 entraine une modification en nombre ou en sensibilité de ces récepteurs, ce qui pourrait expliquer que quelque soit la méthode pharmacologique chronique employée, la conséquence serait l'apparition d'effets secondaires liés à la dérégulation de la fonction CB1.

Enfin, l'administration chronique (15 jours) de fortes doses d'AEA (20 mg/kg) chez le rat ne modifie pas la densité mais produit la désensibilisation des récepteurs CB1 dans le striatum, le cortex, l'hippocampe et le cerebellum (Rubino et al., 2000). En outre, chez les souris KO FAAH-/- l'administration d'AEA entraine à la fois une désensibilisation et une diminution du nombre de récepteurs CB1, mais toutefois moins importante qu'après

administration de THC (Falenski et al., 2010). L'ensemble de ces données suggère que lorsque l'AEA est présent en forte concentration, le système s'adapterait à cette sur-stimulation par une désensibilisation et/ou une diminution de la densité des récepteurs CB1 au niveau des structures où l'AEA est libéré.

Plusieurs études ont montré que l'exposition chronique à la nicotine ne modifiait pas la fonctionnalité et la densité des récepteurs CB1 dans le cerveau des rats adultes (Gonzalez et al., 2002; Werling et al., 2009; Gerard et al., 2010). Cependant, dans ces études, la durée d'exposition à la nicotine variait entre 7 et 15 jours (Gonzalez et al., 2002; Werling et al., 2009; Gerard et al., 2010). De plus, les mêmes périodes d'exposition à la nicotine chez les rats adolescents, augmente la densité des récepteurs CB1 dans les régions impliquées dans les effets renforçants des drogues (ATV, CPF et HPC) (Werling et al., 2009). On ne peut donc pas exclure dans notre étude qu'une période d'exposition plus longue entraine des modifications sur les récepteurs CB1.

Par ailleurs, ces données s'accordent sur le fait que l'exposition chronique à la nicotine augmente les taux d'eCB disponibles dans le cerveau (Gonzalez et al., 2002). Ainsi, dans notre étude, l'exposition à la nicotine pourrait activer le système eCB de manière constitutive. L'administration chronique d'un inhibiteur de l'enzyme de dégradation de l'AEA pourrait provoquer alors une augmentation de la disponibilité de l'AEA à des concentrations non physiologiques, entrainant ainsi la désensibilisation des récepteurs CB1. Une augmentation chronique des niveaux d'AEA serait plus importante chez les animaux ayant consommé de fortes quantités de nicotine. Par conséquent au moment de l'administration de l'URB597, les quantités d'AEA présentes entraineraient une sur-activation des récepteurs CB1 provoquant ainsi une plus forte désensibilisation de ces récepteurs, responsable de l'émergence d'un état anxieux.

Les deux 2 neurotransmetteurs principaux du SEC sont : l'AEA et le 2-AG. Il a été montré que l'inhibition de la FAAH dans le striatum, en augmentant les niveaux d'AEA et l'activité TRPV1, inhibe indirectement la biosynthèse du 2-AG, l'autre eCB du système nerveux central (Maccarrone et al., 2008). Alors que le 2-AG se fixe sélectivement sur les récepteurs cannabinoïdes CB1 et CB2, l'AEA se fixe sur les récepteurs CB1 mais également sur les TRPV1 (Zygmunt et al., 1999; Pertwee, 2008; Vriens et al., 2009). D'autre part, les études anatomiques et d'électrophysiologiques indiquent que dans le cerveau, le 2-AG plus que l'AEA est le ligand naturel des récepteurs cannabinoïdes et le principal eCB impliqué dans le

signal rétrograde neuronal (Sugiura et al., 2006; Tanimura et al., 2010). Les effets du 2-AG ont été beaucoup moins étudiés que ceux de l'AEA du fait du manque d'outil pour modifier les niveaux de 2-AG. Récemment, la mise au point du JZL184 : un inhibiteur de l'enzyme de dégradation du 2-AG (la MAGL) (Long et al., 2009a) a permis une avancée considérable dans la compréhension de l'implication du 2-AG dans différents processus.

Plusieurs données suggèrent un rôle du 2-AG dans les processus de l'addiction.

Les concentrations de 2-AG sont modulées par l'exposition aux drogues telles que le THC (Di Marzo et al., 2000b), les opiacés (Gonzalez et al., 2002; Vigano et al., 2003; Caille et al., 2007), l'alcool (Gonzalez et al., 2002; Caille et al., 2007) et la nicotine (Gonzalez et al., 2002). Récemment, l'auto-administration de 2-AG a été montré chez le singe. L'inhibition de ce comportement par un antagoniste CB1 atteste du rôle du 2-AG comme renforçateur effectif de la prise de drogue via les récepteurs CB1 (Justinova et al., 2011).

De plus en plus, d'études suggèrent le rôle de 2-AG dans la modulation de l'état anxieux. L'inhibition de l'enzyme de dégradation du 2-AG induit un effet anxiolytique dans le test du labyrinthe en croix surélevé, cet effet est annulé par un prétraitement avec un antagoniste des récepteurs CB2, mais persiste chez les souris KO CB1(Busquets-Garcia et al., 2011). L'effet anxiolytique de l'augmentation du tonus 2-AG est indépendant des récepteurs CB1 et est modulé via les récepteurs CB2. De plus, la surexpression des récepteurs CB2 diminue la vulnérabilité à développer un état anxieux (Garcia-Gutierrez and Manzanares, 2011). Ainsi dans notre étude, la diminution de la quantité de 2-AG par le traitement URB597 pourrait également expliquer l'altération de l'état émotionnel.

III. ROLE DES ELEMENTS QUI N'APPARTIENNENT PAS AU SEC

Dans le chapitre suivant, nous verrons que les conséquences du traitement chronique à l'URB597 et de l'augmentation de l'AEA peuvent être expliqués par la mis en jeu d'autres systèmes qui n'appartiennent pas au SEC.

III.A. Les récepteurs TRPV1

L'AEA peut, à forte dose (10 μM), aussi se fixer et activer les récepteurs vanilloïdes de type TRPV1 (transient potential receptor of vanilloid) (Di Marzo et al., 1998; Howlett and

Mukhopadhyay, 2000; Smart et al., 2000; Zygmunt et al., 1999). De plus, des études chez les souris déficientes pour les récepteurs TRPV1 suggèrent leur implication dans certains effets de l'AEA (Pacher et al., 2004; Marsch et al., 2007). Par ailleurs, un nombre croissant d'études suggère que les TRPV1 jouent un rôle central dans l'expression des effets anxiogènes observés lors de la modulation du SEC (pour revue, lire REF Moreira FA et al. Neuroscience 2011 in press).

Les récepteurs TRPV1 et CB1 sont co-exprimés dans les régions du cerveau impliquées dans le contrôle des émotions telles que les couches II/III et V du CPF, le shell du Nac, les régions CA1 et CA3 de l'HPC et l'amygdale (Micale et al., 2009). En se fixant sur les TRPV1, l'AEA entraine une élévation des niveaux de calcium et la potentialisation de la transmission synaptique glutamatergique (Starowicz et al., 2007b; Kawahara et al., 2011) perturbant la balance excitatrice/inhibitrice et favorisant ainsi l'apparition d'un état anxieux. Chez les rats naïfs, l'AEA et URB597 produisent un effet anxiolytique lorsqu'ils sont administrés séparement et en aigu ; alors qu'ils ont un effet anxiogène quand ils sont combinés (Scherma et al., 2008b). Ces données suggèrent qu'une augmentation trop marquée des niveaux d'AEA peut produire une réponse de type anxieuse. De plus, il a été montré que l'administration d'URB597 dans le CPF produisait à faibles doses un effet anxiolytique et à fortes doses un effet anxiogène. Cet effet anxiogène serait indépendant des récepteurs CB1 et dépendant des récepteurs TRPV1 (Rubino et al., 2008a).

Si l'exposition chronique à la nicotine entraine une diminution des récepteurs CB1 ou une activation constitutive de la synthèse d'AEA, l'administration d'URB597 chez les rats abstinents de la nicotine conduit à une augmentation forte des niveaux d'AEA qui se fixe sur les récepteurs CB1 et les TRPV1 entrainant l'émergence d'un état anxieux.

Enfin, il a été montré que la nicotine pouvait sensibiliser les récepteurs TRPV1 (Liu et al., 2004). Ces données apportent une explication potentielle concernant les différences observées au niveau de l'anxiété entre nos rats NU- et NU+. Dans notre étude, les rats ayant consommé de fortes quantités de nicotine présenteraient une plus grande sensibilité des récepteurs TRPV1 responsables de l'émergence de l'état anxieux lors d'une forte libération d'AEA.

Dans une étude, Seillier et Giuffrida se sont intéressés aux effets de l'URB597 sur l'état d'anxiété des rats abstinents à la phenylcyclidine (PCP), un psychotrope hallucinogène antagoniste des récepteurs au glutamate NMDA. Le test du labyrinthe en croix surélevé réalisé 5 jours après la dernière injection a permis d'observer, comme dans notre étude, l'occurrence d'un état anxieux via un mécanisme indépendant des récepteurs CB1 chez les

rats abstinents traités à l'URB597 et un effet anxiolytique CB1-dépendant chez les rats abstinents non traités (Seillier and Giuffrida, 2011). Ces données et nos résultats suggèrent que l'exposition chronique ou sub-choniques aux substances d'abus entraine des modifications persistantes du SEC et des TRPV1 qui sont révélées par l'inhibition de l'enzyme de dégradation de l'AEA. On observe alors l'induction d'un état anxieux via un mécanisme TRPV1-dépendant. Ainsi, l'activation des TRPV1 conduit à un effet opposé à l'activation des récepteurs CB1, et diminue l'efficacité du traitement URB597 sur l'anxiété. Pour cette raison il a été proposé que l'inhibition de la FAAH associée à une inhibition de l'activité TRPV1 par une molécule comme la AA-5-HT (arachidonoyl sérotonine) (Maione et al., 2007) pourrait se révéler plus efficace contre l'anxiété que l'inhibition sélective de la FAAH par l'URB597 (Micale et al., 2009). L'administration aiguë de AA-5HT chez les souris C57BL/6J produit un effet anxiolytique à faible dose qui s'accompagne d'une augmentation du tonus endocannabinoïde mais est sans effet à forte dose, preuve que l'effet anxiogène observé dans notre test est bien sous-tendu par les TRPV1.

III.B. Les récepteurs PPAR-α

Dans le cerveau, l'URB597 a pour première cible le blocage de l'hydrolyse de l'AEA, mais des études ont montré que l'URB597 augmente également les niveaux de composés acylethanolamides non cannabinoïdes comme l'oleoylethanolamide (OEA) et de palmitoylethanolamide (PEA). Ces molécules sont des ligands du récepteur PPAR-α (alpha type peroxisome proliferator-activated receptor), un récepteur nucléaire des facteurs de transcription (Fegley et al., 2005; Astarita et al., 2006). A la périphérie, les récepteurs PPAR-α sont impliqués dans le métabolisme lipidique et la régulation de la balance énergétique (Rodriguez de Fonseca et al., 2001; Fu et al., 2003) et ils possèdent des propriétés analgésiques dans les modèles de douleurs viscérales et inflammatoires (Lo Verme et al., 2005; Suardiaz et al., 2007). Au niveau central, ces récepteurs sont ubiquitaires (Moreno et al., 2004) mais leur rôle est encore mal connu. Cependant, il semblerait qu'ils jouent un rôle dans la diminution des propriétés renforçantes de la nicotine (Melis et al., 2008; Mascia et al., 2011). En effet, les agonistes de PPAR-α, WY14643 et metOAE, diminuent les effets renforçants de la nicotine : ils diminuent l'auto-administration de nicotine, bloquent sa réinstallation et diminuent également de manière dose dépendante l'activation des neurones DA de l'ATV et l'élévation de DA induite par la nicotine dans le Nac (Mascia et al., 2011).

Ces données posent donc la question de l'implication spécifique de l'AEA dans la modulation des propriétés renforçantes et incitatives de la nicotine.

Récemment plusieurs études ont été menées afin de déterminer l'implication spécifique de chacun des ligands dans la diminution des effets renforçants de la nicotine par l'URB597. Par exemple, Gamaleddin et coll. (Gamaleddin et al., 2011) ont étudié l'effet de l'inhibition d'un transporteur transmembranaire sélectif de l'AEA (VDM11) sur la motivation persistante pour la nicotine dans un modèle d'auto-administration de nicotine chez le rat. Le VDM11 présente l'avantage par rapport à l'URB597, d'augmenter spécifiquement les niveaux extracellulaires d'AEA sans modifier les niveaux extracellulaires d'OEA et PEA (De Petrocellis et al., 2000; van der Stelt et al., 2006). L'administration aiguë de VDM11, de façon similaire à l'administration aiguë de l'URB597 (Forget et al., 2009), n'affecte pas le comportement d'auto-administration intraveineuse de nicotine une fois que celui-ci est robuste et stable. En revanche, le VDM11 peut bloquer les propriétés incitatives de la nicotine ou des stimuli associés à la prise de nicotine et donc diminuer la motivation persistante pour la recherche de nicotine (Gamaleddin et al., 2011).

Il existe un second inhibiteur du transporteur transmembranaire de l'AEA qui est l'AM404 (Scherma et al., 2011). L'AM404 a la particularité d'augmenter les niveaux extracellulaires tant de l'AEA (Beltramo et al., 1997) que ceux du 2-AG (Beltramo and Piomelli, 2000). L'utilisation de l'AM404 a permis de confirmer l'implication de l'AEA dans la diminution des effets renforçants de la nicotine (Scherma et al., 2011) car son administration bloque la préférence de place pour la nicotine, diminue sa réinstallation et diminue l'élévation de DA induite par la nicotine dans le Nac.

Toutes ces données confirment bien la participation de l'AEA dans la diminution des effets renforçants de la nicotine. Ces études suggèrent également que les effets de l'URB597 ne sont pas entièrement dépendants de la stimulation des récepteurs CB1 par les AEA et désignent les récepteurs PPAR-α comme une potentielle nouvelle cible pour le traitement de l'addiction à la nicotine.

IV. Perspectives

Les fumeurs apparaissent comme une population hétérogène quant aux déterminants impliqués dans l'initiation et le maintien de la dépendance. Par ailleurs, chez l'homme tous les individus ne sont pas sensibles à la nicotine de la même manière, ce qui se répercute sur leur profil de consommation. Au regard de ces différences, il paraissait donc nécessaire de développer différentes stratégies tenant compte des spécificités individuelles. L'hétérogénéité de consommation est un élément d'autant plus important qu'il explique peut-être la grande variabilité dans la réponse aux différentes approches thérapeutiques pour le traitement de la dépendance tabagique. Dans notre étude, nous avons montré qu'une longue période d'exposition à la nicotine par le modèle d'auto-administration intraveineuse permettait de rendre compte de ces différences. A l'avenir, il est donc important de prendre en compte la variabilité inter-individuelle dans la consommation de la drogue pour tester les effets chronique d'une molécule donnée. A l'inverse, il serait intéressant de déterminer si cette même molécule a les mêmes conséquences sur une population exposée à une quantité de drogue contrôlée et identique pour tous. Comme le soulignent de récentes études (Deroche-Gamonet et al., 2004; Belin et al., 2008), la prise en compte de la variabilité interindividuelle est un des grands enjeux du succès des traitements de l'addiction. Par ailleurs, il sera également intéressant d'examiner si les éléments qui déterminent les conséquences à long terme d'une consommation abusive d'une drogue sont généralisables à toutes les drogues.

Il existe diffèrenst traitements pour la dépendance tabagique ; les traitements remplaçant les effets de la nicotine comme de les substituts nicotiniques : timbre transdermique, gomme à mâcher, comprimés sublinguaux, le Zyban®(le bupropion) un inhibiteur sélectif de la recapture des monoamines et le Champix® (la varinicline) un agoniste partiel des récepteurs nicotiniques. Toutes ces approches thérapeutiques nécessitent une utilisation longue pour traiter la dépendance. Nos résultats mettent en évidence la limite des approches expérimentales qui ne considèrent que l'effet d'une administration aigue de la molécule quand celle-ci est ultérieurement proposée pour un usage chronique. Il est donc absolument nécessaire de développer chez l'animal des approches qui prennent en compte l'étude longitudinale visant à déterminer les effets majeurs positifs d'un traitement chronique mais également les effets secondaires indésirables.

Une des perspectives de notre étude concise à identifier précisément les cibles de l'URB597 lors du traitement chronique. Comme nous l'avons vu en détail dans le paragraphe III.A ; les mécanismes mis en jeu par la pharmacologie ciblant le SEC implique également le système TRPV1. Des études complémentaires sont nécessaires afin de vérifier l'implication de ces récepteurs dans l'effet pro anxieux du traitement URB597. En effet, l'exposition chronique à la nicotine entrainerait des modifications persistantes du SEC et des TRPV1 qui seraient révélées par l'inhibition de l'enzyme de dégradation de l'AEA. Ainsi, l'activation des TRPV1 conduit à un effet opposé à l'activation des récepteurs CB1, et diminue l'efficacité du traitement URB597 sur l'anxiété. Ces données suggèrent qu'une l'activation "indirecte" des récepteurs CB1 par l'inhibition de la FAAH et le blocage des récepteurs TRPV1 peut représenter une nouvelle stratégie thérapeutique contre l'anxiété. Cependant, des études complémentaires sont nécessaires pour examiner l'effet à long terme de tels traitements et surtout pour vérifier que le blocage des TRPV1, qui sont impliqués dans une pléiade de comportements et notamment dans la perception de la douleur, ne provoque pas d'effets secondaires.

Enfin, nos données soulignent l'importance de l'interaction entre une exposition chronique à la nicotine et l'exposition chronique à l'inhibiteur de la FAAH quant au développement d'un état dépressif et à l'activité de l'axe corticotrope des animaux abstinents. Cependant nos données ne nous permettent pas de conclure. Nous n'avons pour l'instant examiné que le comportement d'immobilité dans le test de la nage forcée. Or, il est nécessaire de faire la quantification des autres comportements qui sont la nage et l'escalade de la paroi. En effet, les corrélats neurobiologiques de ces 2 composantes ont été très bien caractérisés : la nage renseignant sur l'état du système sérotoninergique et l'escalade sur l'état du système noradrénergique. Cette analyse nous donnera certainement des pistes pour l'explication des mécanismes qui pourraient également être impliqués dans les régulations en apparence identiques de l'axe corticotrope chez les groupes dont le profile émotionnel global est pourtant différent.

En conclusion notre étude montre que le système endocannabinoïde est une cible privilégiée pour le traitement de la dépendance tabagique et l'inhibiteur de la FAAH peut être un outil adapté à condition de prendre en compte la variabilité interindividuelle que l'on rencontre dans l'addiction à la nicotine.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adams IB, Compton DR, Martin BR (1998) Assessment of anandamide interaction with the cannabinoid brain receptor: SR 141716A antagonism studies in mice and autoradiographic analysis of receptor binding in rat brain. J Pharmacol Exp Ther 284:1209-1217.

Agboola S, McNeill A, Coleman T, Leonardi Bee J (2010) A systematic review of the effectiveness of smoking relapse prevention interventions for abstinent smokers. Addiction 105:1362-1380.

Aguiar DC, Terzian AL, Guimaraes FS, Moreira FA (2009) Anxiolytic-like effects induced by blockade of transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) channels in the medial prefrontal cortex of rats. Psychopharmacology (Berl) 205:217-225.

Ahern GP (2003) Activation of TRPV1 by the satiety factor oleoylethanolamide. J Biol Chem 278:30429-30434.

Ahmed SH, Koob GF (1998) Transition from moderate to excessive drug intake: change in hedonic set point. Science 282:298-300.

Akbas F, Gasteyger C, Sjodin A, Astrup A, Larsen TM (2009) A critical review of the cannabinoid receptor as a drug target for obesity management. Obes Rev 10:58-67.

al'Absi M, Amunrud T, Wittmers LE (2002) Psychophysiological effects of nicotine abstinence and behavioral challenges in habitual smokers. Pharmacol Biochem Behav 72:707-716.

Alonso R, Voutsinos B, Fournier M, Labie C, Steinberg R, Souilhac J, Le Fur G, Soubrie P (1999) Blockade of cannabinoid receptors by SR141716 selectively increases Fos expression in rat mesocorticolimbic areas via reduced dopamine D2 function. Neuroscience 91:607-620.

Anderson-Baker WC, McLaughlin CL, Baile CA (1979) Oral and hypothalamic injections of barbiturates, benzodiazepines and cannabinoids and food intake in rats. Pharmacol Biochem Behav 11:487-491.

Andreoli M, Tessari M, Pilla M, Valerio E, Hagan JJ, Heidbreder CA (2003) Selective antagonism at dopamine D3 receptors prevents nicotine-triggered relapse to nicotine-seeking behavior. Neuropsychopharmacology 28:1272-1280.

Arevalo C, de Miguel R, Hernandez-Tristan R (2001) Cannabinoid effects on anxiety-related behaviours and hypothalamic neurotransmitters. Pharmacol Biochem Behav 70:123-131.

Ashton JC, Friberg D, Darlington CL, Smith PF (2006) Expression of the cannabinoid CB2 receptor in the rat cerebellum: an immunohistochemical study. Neurosci Lett 396:113-116.

Aso E, Ozaita A, Valdizan EM, Ledent C, Pazos A, Maldonado R, Valverde O (2008) BDNF impairment in the hippocampus is related to enhanced despair behavior in CB1 knockout mice. J Neurochem 105:565-572.

Astarita G, Di Giacomo B, Gaetani S, Oveisi F, Compton TR, Rivara S, Tarzia G, Mor M, Piomelli D (2006) Pharmacological characterization of hydrolysis-resistant analogs of oleoylethanolamide with potent anorexiant properties. J Pharmacol Exp Ther 318:563-570.

Aston-Jones G, Harris GC (2004) Brain substrates for increased drug seeking during protracted withdrawal. Neuropharmacology 47 Suppl 1:167-179.

Auriacombe M, Reneric JP, Le Moal M (1997) Animal models of anhedonia. Psychopharmacology (Berl) 134:337-338; discussion 371-337.

Balerio GN, Aso E, Maldonado R (2006) Role of the cannabinoid system in the effects induced by nicotine on anxiety-like behaviour in mice. Psychopharmacology (Berl) 184:504-513.

Balerio GN, Aso E, Berrendero F, Murtra P, Maldonado R (2004) Delta9-tetrahydrocannabinol decreases somatic and motivational manifestations of nicotine withdrawal in mice. Eur J Neurosci 20:2737-2748.

Baxter MG, Murray EA (2002) The amygdala and reward. Nat Rev Neurosci 3:563-573.

Begg M, Pacher P, Batkai S, Osei-Hyiaman D, Offertaler L, Mo FM, Liu J, Kunos G (2005) Evidence for novel cannabinoid receptors. Pharmacol Ther 106:133-145.

Belin D, Mar AC, Dalley JW, Robbins TW, Everitt BJ (2008) High impulsivity predicts the switch to compulsive cocaine-taking. Science 320:1352-1355.

Bellocchio L, Lafenetre P, Cannich A, Cota D, Puente N, Grandes P, Chaouloff F, Piazza PV, Marsicano G (2010) Bimodal control of stimulated food intake by the endocannabinoid system. Nat Neurosci 13:281-283.

Beltramo M, Piomelli D (2000) Carrier-mediated transport and enzymatic hydrolysis of the endogenous cannabinoid 2-arachidonylglycerol. Neuroreport 11:1231-1235.

Beltramo M, Stella N, Calignano A, Lin SY, Makriyannis A, Piomelli D (1997) Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. Science 277:1094-1097.

Besson M, David V, Baudonnat M, Cazala P, Guilloux JP, Reperant C, Cloez-Tayarani I, Changeux JP, Gardier AM, Granon S (2011) Alpha7-nicotinic receptors modulate nicotine-induced reinforcement and extracellular dopamine outflow in the mesolimbic system in mice. Psychopharmacology (Berl).

Beyer CE, Dwyer JM, Piesla MJ, Platt BJ, Shen R, Rahman Z, Chan K, Manners MT, Samad TA, Kennedy JD, Bingham B, Whiteside GT (2010) Depression-like phenotype following chronic CB1 receptor antagonism. Neurobiol Dis 39:148-155.

Bisogno T, Melck D, Bobrov M, Gretskaya NM, Bezuglov VV, De Petrocellis L, Di Marzo V (2000) N-acyl-dopamines: novel synthetic CB(1) cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabimimetic activity in vitro and in vivo. Biochem J 351 Pt 3:817-824.

Bortolato M, Mangieri RA, Fu J, Kim JH, Arguello O, Duranti A, Tontini A, Mor M, Tarzia G, Piomelli D (2007) Antidepressant-like activity of the fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 in a rat model of chronic mild stress. Biol Psychiatry 62:1103-1110.

Bortolato M, Campolongo P, Mangieri RA, Scattoni ML, Frau R, Trezza V, La Rana G, Russo R, Calignano A, Gessa GL, Cuomo V, Piomelli D (2006) Anxiolytic-like properties of the anandamide transport inhibitor AM404. Neuropsychopharmacology 31:2652-2659.

Brown SM, Wager-Miller J, Mackie K (2002) Cloning and molecular characterization of the rat CB2 cannabinoid receptor. Biochim Biophys Acta 1576:255-264.

Buczek Y, Le AD, Wang A, Stewart J, Shaham Y (1999) Stress reinstates nicotine seeking but not sucrose solution seeking in rats. Psychopharmacology (Berl) 144:183-188.

Bura SA, Burokas A, Martin-Garcia E, Maldonado R (2010) Effects of chronic nicotine on food intake and anxiety-like behaviour in CB(1) knockout mice. Eur Neuropsychopharmacol 20:369-378.

Burdyga G, Lal S, Varro A, Dimaline R, Thompson DG, Dockray GJ (2004) Expression of cannabinoid CB1 receptors by vagal afferent neurons is inhibited by cholecystokinin. J Neurosci 24:2708-2715.

Busquets-Garcia A, Puighermanal E, Pastor A, de la Torre R, Maldonado R, Ozaita A (2011) Differential role of anandamide and 2-arachidonoylglycerol in memory and anxiety-like responses. Biol Psychiatry 70:479-486.

Butt C, Alptekin A, Shippenberg T, Oz M (2008) Endogenous cannabinoid anandamide inhibits nicotinic acetylcholine receptor function in mouse thalamic synaptosomes. J Neurochem 105:1235-1243.

Cadas H, di Tomaso E, Piomelli D (1997) Occurrence and biosynthesis of endogenous cannabinoid precursor, N-arachidonoyl phosphatidylethanolamine, in rat brain. J Neurosci 17:1226-1242.

Caggiula AR, Donny EC, White AR, Chaudhri N, Booth S, Gharib MA, Hoffman A, Perkins KA, Sved AF (2001) Cue dependency of nicotine self-administration and smoking. Pharmacol Biochem Behav 70:515-530.

Cahill K, Ussher M (2007) Cannabinoid type 1 receptor antagonists (rimonabant) for smoking cessation. Cochrane Database Syst Rev:CD005353.

Caille S, Parsons LH (2003) SR141716A reduces the reinforcing properties of heroin but not heroin-induced increases in nucleus accumbens dopamine in rats. Eur J Neurosci 18:3145-3149.

Caille S, Parsons LH (2006) Cannabinoid modulation of opiate reinforcement through the ventral striatopallidal pathway. Neuropsychopharmacology 31:804-813.

Caille S, Alvarez-Jaimes L, Polis I, Stouffer DG, Parsons LH (2007) Specific alterations of extracellular endocannabinoid levels in the nucleus accumbens by ethanol, heroin, and cocaine self-administration. J Neurosci 27:3695-3702.

Caille S, Guillem K, Cador M, Manzoni O, Georges F (2009) Voluntary nicotine consumption triggers in vivo potentiation of cortical excitatory drives to midbrain dopaminergic neurons. J Neurosci 29:10410-10415.

Calignano A, La Rana G, Piomelli D (2001) Antinociceptive activity of the endogenous fatty acid amide, palmitylethanolamide. Eur J Pharmacol 419:191-198.

Castane A, Valjent E, Ledent C, Parmentier M, Maldonado R, Valverde O (2002) Lack of CB1 cannabinoid receptors modifies nicotine behavioural responses, but not nicotine abstinence. Neuropharmacology 43:857-867.

Changeux JP (2010) Nicotine addiction and nicotinic receptors: lessons from genetically modified mice. Nat Rev Neurosci 11
389-401.
Changeux JP, Bertrand D, Corringer PJ, Dehaene S, Edelstein S, Lena C, Le Novere N, Marubio L, Picciotto M, Zoli M (1998) Brain nicotinic receptors: structure and regulation, role in learning and reinforcement. Brain Res Brain Res Rev 26:198-216.
Chaouloff F, Laude D, Merino D, Serrurier B, Elghozi JL (1989) Peripheral and central consequences of immobilization stress in genetically obese Zucker rats. Am J Physiol 256:R435-442.
Chaperon F, Thiebot MH (1999) Behavioral effects of cannabinoid agents in animals. Crit Rev Neurobiol 13:243-281.
Chaperon F, Soubrie P, Puech AJ, Thiebot MH (1998) Involvement of central cannabinoid (CB1) receptors in the establishment of place conditioning in rats. Psychopharmacology (Berl) 135:324-332.
Charpantier E, Barneoud P, Moser P, Besnard F, Sgard F (1998) Nicotinic acetylcholine subunit mRNA expression in dopaminergic neurons of the rat substantia nigra and ventral tegmental area. Neuroreport 9:3097-3101.
Cheer JF, Wassum KM, Sombers LA, Heien ML, Ariansen JL, Aragona BJ, Phillips PE, Wightman RM (2007) Phasic dopamine release evoked by abused substances requires cannabinoid receptor activation. J Neurosci 27:791-795.
Chen H, Fu Y, Sharp BM (2008) Chronic nicotine self-administration augments hypothalamic-pituitary-adrenal responses to mild acute stress. Neuropsychopharmacology 33:721-730.
Chiamulera C, Borgo C, Falchetto S, Valerio E, Tessari M (1996) Nicotine reinstatement of nicotine self-administration after long-term extinction. Psychopharmacology (Berl) 127:102-107.
Childers SR, Breivogel CS (1998) Cannabis and endogenous cannabinoid systems. Drug Alcohol Depend 51:173-187.
Christensen R, Kristensen PK, Bartels EM, Bliddal H, Astrup A (2007) Efficacy and safety of the weight-loss drug rimonabant: a meta-analysis of randomised trials. Lancet 370:1706-1713.
Chu CJ, Huang SM, De Petrocellis L, Bisogno T, Ewing SA, Miller JD, Zipkin RE, Daddario N, Appendino G, Di Marzo V, Walker JM (2003) N-oleoyldopamine, a novel endogenous capsaicin-like lipid that produces hyperalgesia. J Biol Chem 278:13633-13639.
Clapper JR, Mangieri RA, Piomelli D (2009) The endocannabinoid system as a target for the treatment of cannabis dependence. Neuropharmacology 56 Suppl 1:235-243.
Clemens KJ, Caille S, Cador M (2010) The effects of response operandum and prior food training on intravenous nicotine self-administration in rats. Psychopharmacology (Berl) 211:43-54.
Clemens KJ, Caille S, Stinus L, Cador M (2009) The addition of five minor tobacco alkaloids increases nicotine-induced hyperactivity, sensitization and intravenous self-administration in rats. Int J Neuropsychopharmacol 12:1355-1366.
Cohen C, Kodas E, Griebel G (2005a) CB1 receptor antagonists for the treatment of nicotine addiction. Pharmacol Biochem Behav 81:387-395.
Cohen C, Perrault G, Griebel G, Soubrie P (2005b) Nicotine-associated cues maintain nicotine-seeking behavior in rats several weeks after nicotine withdrawal: reversal by the cannabinoid (CB1) receptor antagonist, rimonabant (SR141716). Neuropsychopharmacology 30:145-155.
Cohen C, Perrault G, Voltz C, Steinberg R, Soubrie P (2002) SR141716, a central cannabinoid (CB(1)) receptor antagonist, blocks the motivational and dopamine-releasing effects of nicotine in rats. Behav Pharmacol 13:451-463.
Colombo G, Serra S, Brunetti G, Gomez R, Melis S, Vacca G, Carai MM, Gessa L (2002) Stimulation of voluntary ethanol intake by cannabinoid receptor agonists in ethanol-preferring sP rats. Psychopharmacology (Berl) 159:181-187.
Compton DR, Aceto MD, Lowe J, Martin BR (1996) In vivo characterization of a specific cannabinoid receptor antagonist (SR141716A): inhibition of delta 9-tetrahydrocannabinol-induced responses and apparent agonist activity. J Pharmacol Exp Ther 277:586-594.
Corrigall WA, Coen KM (1989) Nicotine maintains robust self-administration in rats on a limited-access schedule. Psychopharmacology (Berl) 99:473-478.

Corrigall WA, Coen KM, Adamson KL (1994) Self-administered nicotine activates the mesolimbic dopamine system through the ventral tegmental area. Brain Res 653:278-284.

Corringer PJ, Sallette J, Changeux JP (2006) Nicotine enhances intracellular nicotinic receptor maturation: a novel mechanism of neural plasticity? J Physiol Paris 99:162-171.

Cossu G, Ledent C, Fattore L, Imperato A, Bohme GA, Parmentier M, Fratta W (2001) Cannabinoid CB1 receptor knockout mice fail to self-administer morphine but not other drugs of abuse. Behav Brain Res 118:61-65.

Cota D (2008) The role of the endocannabinoid system in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. J Neuroendocrinol 20 Suppl 1:35-38.

Couturier S, Bertrand D, Matter JM, Hernandez MC, Bertrand S, Millar N, Valera S, Barkas T, Ballivet M (1990) A neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit (alpha 7) is developmentally regulated and forms a homo-oligomeric channel blocked by alpha-BTX. Neuron 5:847-856.

Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB (1996) Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. Nature 384:83-87.

Crawley JN, Corwin RL, Robinson JK, Felder CC, Devane WA, Axelrod J (1993) Anandamide, an endogenous ligand of the cannabinoid receptor, induces hypomotility and hypothermia in vivo in rodents. Pharmacol Biochem Behav 46:967-972.

Cristino L, de Petrocellis L, Pryce G, Baker D, Guglielmotti V, Di Marzo V (2006) Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. Neuroscience 139:1405-1415.

D'Souza MS, Markou A (2011) Metabotropic glutamate receptor 5 antagonist 2-methyl-6-(phenylethynyl)pyridine (MPEP) microinfusions into the nucleus accumbens shell or ventral tegmental area attenuate the reinforcing effects of nicotine in rats. Neuropharmacology 61:1399-1405.

Dani JA, Heinemann S (1996) Molecular and cellular aspects of nicotine abuse. Neuron 16:905-908.

de Lago E, Fernandez-Ruiz J, Ortega-Gutierrez S, Viso A, Lopez-Rodriguez ML, Ramos JA (2002) UCM707, a potent and selective inhibitor of endocannabinoid uptake, potentiates hypokinetic and antinociceptive effects of anandamide. Eur J Pharmacol 449:99-103.

De Petrocellis L, Davis JB, Di Marzo V (2001) Palmitoylethanolamide enhances anandamide stimulation of human vanilloid VR1 receptors. FEBS Lett 506:253-256.

De Petrocellis L, Bisogno T, Davis JB, Pertwee RG, Di Marzo V (2000) Overlap between the ligand recognition properties of the anandamide transporter and the VR1 vanilloid receptor: inhibitors of anandamide uptake with negligible capsaicin-like activity. FEBS Lett 483:52-56.

De Vries TJ, de Vries W, Janssen MC, Schoffelmeer AN (2005) Suppression of conditioned nicotine and sucrose seeking by the cannabinoid-1 receptor antagonist SR141716A. Behav Brain Res 161:164-168.

De Vries TJ, Shaham Y, Homberg JR, Crombag H, Schuurman K, Dieben J, Vanderschuren LJ, Schoffelmeer AN (2001) A cannabinoid mechanism in relapse to cocaine seeking. Nat Med 7:1151-1154.

Deneris ES, Boulter J, Swanson LW, Patrick J, Heinemann S (1989) Beta 3: a new member of nicotinic acetylcholine receptor gene family is expressed in brain. J Biol Chem 264:6268-6272.

Deroche-Gamonet V, Belin D, Piazza PV (2004) Evidence for addiction-like behavior in the rat. Science 305:1014-1017.

Despres JP, Golay A, Sjostrom L (2005) Effects of rimonabant on metabolic risk factors in overweight patients with dyslipidemia. N Engl J Med 353:2121-2134.

Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. Science 258:1946-1949.

Di Chiara G (2000) Role of dopamine in the behavioural actions of nicotine related to addiction. Eur J Pharmacol 393:295-314.

Di Chiara G (2002) Nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction. Behav Brain Res 137:75-114.

Di Chiara G, Imperato A (1988) Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. Proc Natl Acad Sci U S A 85:5274-5278.

Di Chiara G, Bassareo V (2007) Reward system and addiction: what dopamine does and doesn't do. Curr Opin Pharmacol 7:69-76.

Di Marzo V, Matias I (2005) Endocannabinoid control of food intake and energy balance. Nat Neurosci 8:585-589.

Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L (2004) The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. Nat Rev Drug Discov 3:771-784.

Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Piomelli D (1994) Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. Nature 372:686-691.

Di Marzo V, Breivogel CS, Tao Q, Bridgen DT, Razdan RK, Zimmer AM, Zimmer A, Martin BR (2000a) Levels, metabolism, and pharmacological activity of anandamide in CB(1) cannabinoid receptor knockout mice: evidence for non-CB(1), non-CB(2) receptor-mediated actions of anandamide in mouse brain. J Neurochem 75:2434-2444.

Di Marzo V, Berrendero F, Bisogno T, Gonzalez S, Cavaliere P, Romero J, Cebeira M, Ramos JA, Fernandez-Ruiz JJ (2000b) Enhancement of anandamide formation in the limbic forebrain and reduction of endocannabinoid contents in the striatum of delta9-tetrahydrocannabinol-tolerant rats. J Neurochem 74:1627-1635.

Diergaarde L, van Mourik Y, Pattij T, Schoffelmeer AN, De Vries TJ (2010) Poor impulse control predicts inelastic demand for nicotine but not alcohol in rats. Addict Biol.

Diergaarde L, Pattij T, Poortvliet I, Hogenboom F, de Vries W, Schoffelmeer AN, De Vries TJ (2008) Impulsive choice and impulsive action predict vulnerability to distinct stages of nicotine seeking in rats. Biol Psychiatry 63:301-308.

Dineley-Miller K, Patrick J (1992) Gene transcripts for the nicotinic acetylcholine receptor subunit, beta4, are distributed in multiple areas of the rat central nervous system. Brain Res Mol Brain Res 16:339-344.

Dinh TP, Carpenter D, Leslie FM, Freund TF, Katona I, Sensi SL, Kathuria S, Piomelli D (2002) Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. Proc Natl Acad Sci U S A 99:10819-10824.

Donny EC, Caggiula AR, Mielke MM, Booth S, Gharib MA, Hoffman A, Maldovan V, Shupenko C, McCallum SE (1999) Nicotine self-administration in rats on a progressive ratio schedule of reinforcement. Psychopharmacology (Berl) 147:135-142.

Dumont EC, Mark GP, Mader S, Williams JT (2005) Self-administration enhances excitatory synaptic transmission in the bed nucleus of the stria terminalis. Nat Neurosci 8:413-414.

Economidou D, Mattioli L, Cifani C, Perfumi M, Massi M, Cuomo V, Trabace L, Ciccocioppo R (2006) Effect of the cannabinoid CB1 receptor antagonist SR-141716A on ethanol self-administration and ethanol-seeking behaviour in rats. Psychopharmacology (Berl) 183:394-403.

Edelstein SJ, Changeux JP (1998) Allosteric transitions of the acetylcholine receptor. Adv Protein Chem 51:121-184.

Egertova M, Cravatt BF, Elphick MR (2003) Comparative analysis of fatty acid amide hydrolase and cb(1) cannabinoid receptor expression in the mouse brain: evidence of a widespread role for fatty acid amide hydrolase in regulation of endocannabinoid signaling. Neuroscience 119:481-496.

Eisenstein SA, Clapper JR, Holmes PV, Piomelli D, Hohmann AG (2010) A role for 2-arachidonoylglycerol and endocannabinoid signaling in the locomotor response to novelty induced by olfactory bulbectomy. Pharmacol Res 61:419-429.

El Manira A, Kyriakatos A (2010) The role of endocannabinoid signaling in motor control. Physiology (Bethesda) 25:230-238.

Erb S, Salmaso N, Rodaros D, Stewart J (2001) A role for the CRF-containing pathway from central nucleus of the amygdala to bed nucleus of the stria terminalis in the stress-induced reinstatement of cocaine seeking in rats. Psychopharmacology (Berl) 158:360-365.

Exley R, Maubourguet N, David V, Eddine R, Evrard A, Pons S, Marti F, Threlfell S, Cazala P, McIntosh JM, Changeux JP, Maskos U, Cragg SJ, Faure P (2011) Distinct contributions of nicotinic acetylcholine

receptor subunit alpha4 and subunit alpha6 to the reinforcing effects of nicotine. Proc Natl Acad Sci U S A 108:7577-7582.
Falenski KW, Thorpe AJ, Schlosburg JE, Cravatt BF, Abdullah RA, Smith TH, Selley DE, Lichtman AH, Sim-Selley LJ (2010) FAAH-/- mice display differential tolerance, dependence, and cannabinoid receptor adaptation after delta 9-tetrahydrocannabinol and anandamide administration. Neuropsychopharmacology 35:1775-1787.
Farooqui AA, Rammohan KW, Horrocks LA (1989) Isolation, characterization, and regulation of diacylglycerol lipases from the bovine brain. Ann N Y Acad Sci 559:25-36.
Fattore L, Melis M, Fadda P, Pistis M, Fratta W (2010) The endocannabinoid system and nondrug rewarding behaviours. Exp Neurol 224:23-36.
Fegley D, Kathuria S, Mercier R, Li C, Goutopoulos A, Makriyannis A, Piomelli D (2004) Anandamide transport is independent of fatty-acid amide hydrolase activity and is blocked by the hydrolysis-resistant inhibitor AM1172. Proc Natl Acad Sci U S A 101:8756-8761.
Fegley D, Gaetani S, Duranti A, Tontini A, Mor M, Tarzia G, Piomelli D (2005) Characterization of the fatty acid amide hydrolase inhibitor cyclohexyl carbamic acid 3'-carbamoyl-biphenyl-3-yl ester (URB597): effects on anandamide and oleoylethanolamide deactivation. J Pharmacol Exp Ther 313:352-358.
Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Mansouri J, Mackie K, Blond O, Lai Y, Ma AL, Mitchell RL (1995) Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. Mol Pharmacol 48:443-450.
Feltenstein MW, See RE (2008) The neurocircuitry of addiction: an overview. Br J Pharmacol 154:261-274.
Fernandez-Espejo E, Galan-Rodriguez B (2004) Sensorimotor gating in mice is disrupted after AM404, an anandamide reuptake and degradation inhibitor. Psychopharmacology (Berl) 175:220-224.
Fernandez JR, Allison DB (2004) Rimonabant Sanofi-Synthelabo. Curr Opin Investig Drugs 5:430-435.
Fezza F, Bisogno T, Minassi A, Appendino G, Mechoulam R, Di Marzo V (2002) Noladin ether, a putative novel endocannabinoid: inactivation mechanisms and a sensitive method for its quantification in rat tissues. FEBS Lett 513:294-298.
File SE, Hyde JR (1978) Can social interaction be used to measure anxiety? Br J Pharmacol 62:19-24.
Filip M, Golda A, Zaniewska M, McCreary AC, Nowak E, Kolasiewicz W, Przegalinski E (2006) Involvement of cannabinoid CB1 receptors in drug addiction: effects of rimonabant on behavioral responses induced by cocaine. Pharmacol Rep 58:806-819.
Forget B, Hamon M, Thiebot MH (2005) Cannabinoid CB1 receptors are involved in motivational effects of nicotine in rats. Psychopharmacology (Berl) 181:722-734.
Forget B, Coen KM, Le Foll B (2009) Inhibition of fatty acid amide hydrolase reduces reinstatement of nicotine seeking but not break point for nicotine self-administration--comparison with CB(1) receptor blockade. Psychopharmacology (Berl) 205:613-624.
Fowler CD, Kenny PJ (2011) Intravenous nicotine self-administration and cue-induced reinstatement in mice: effects of nicotine dose, rate of drug infusion and prior instrumental training. Neuropharmacology 61:687-698.
Freedland CS, Sharpe AL, Samson HH, Porrino LJ (2001) Effects of SR141716A on ethanol and sucrose self-administration. Alcohol Clin Exp Res 25:277-282.
Fu J, Gaetani S, Oveisi F, Lo Verme J, Serrano A, Rodriguez De Fonseca F, Rosengarth A, Luecke H, Di Giacomo B, Tarzia G, Piomelli D (2003) Oleylethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR-alpha. Nature 425:90-93.
Gaetani S, Oveisi F, Piomelli D (2003) Modulation of meal pattern in the rat by the anorexic lipid mediator oleoylethanolamide. Neuropsychopharmacology 28:1311-1316.
Gallate JE, Saharov T, Mallet PE, McGregor IS (1999) Increased motivation for beer in rats following administration of a cannabinoid CB1 receptor agonist. Eur J Pharmacol 370:233-240.
Gamaleddin I, Guranda M, Goldberg SR, Lefoll B (2011) The selective anandamide transport inhibitor VDM11 attenuates reinstatement of nicotine seeking induced by nicotine associated cues and nicotine priming, but does not affect nicotine-intake. Br J Pharmacol.

Gao M, Jin Y, Yang K, Zhang D, Lukas RJ, Wu J (2010) Mechanisms involved in systemic nicotine-induced glutamatergic synaptic plasticity on dopamine neurons in the ventral tegmental area. J Neurosci 30:13814-13825.

Garcia-Gutierrez MS, Manzanares J (2011) Overexpression of CB2 cannabinoid receptors decreased vulnerability to anxiety and impaired anxiolytic action of alprazolam in mice. J Psychopharmacol 25:111-120.

Gardner EL (2011) Addiction and brain reward and antireward pathways. Adv Psychosom Med 30:22-60.

Gatley SJ, Gifford AN, Volkow ND, Lan R, Makriyannis A (1996) 123I-labeled AM251: a radioiodinated ligand which binds in vivo to mouse brain cannabinoid CB1 receptors. Eur J Pharmacol 307:331-338.

Gentry CL, Lukas RJ (2002) Regulation of nicotinic acetylcholine receptor numbers and function by chronic nicotine exposure. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord 1:359-385.

George O, Koob GF (2010) Individual differences in prefrontal cortex function and the transition from drug use to drug dependence. Neurosci Biobehav Rev 35:232-247.

Georges F, Aston-Jones G (2001) Potent regulation of midbrain dopamine neurons by the bed nucleus of the stria terminalis. J Neurosci 21:RC160.

Georges F, Aston-Jones G (2002) Activation of ventral tegmental area cells by the bed nucleus of the stria terminalis: a novel excitatory amino acid input to midbrain dopamine neurons. J Neurosci 22:5173-5187.

Gerard N, Ceccarini J, Bormans G, Vanbilloen B, Casteels C, Goffin K, Bosier B, Lambert DM, Van Laere K (2010) Influence of chronic nicotine administration on cerebral type 1 cannabinoid receptor binding: an in vivo micro-PET study in the rat using [18F]MK-9470. J Mol Neurosci 42:162-167.

Gessa GL, Serra S, Vacca G, Carai MA, Colombo G (2005) Suppressing effect of the cannabinoid CB1 receptor antagonist, SR147778, on alcohol intake and motivational properties of alcohol in alcohol-preferring sP rats. Alcohol Alcohol 40:46-53.

Gobbi G, Bambico FR, Mangieri R, Bortolato M, Campolongo P, Solinas M, Cassano T, Morgese MG, Debonnel G, Duranti A, Tontini A, Tarzia G, Mor M, Trezza V, Goldberg SR, Cuomo V, Piomelli D (2005) Antidepressant-like activity and modulation of brain monoaminergic transmission by blockade of anandamide hydrolysis. Proc Natl Acad Sci U S A 102:18620-18625.

Goldberg SR, Spealman RD, Goldberg DM (1981) Persistent behavior at high rates maintained by intravenous self-administration of nicotine. Science 214:573-575.

Goldberg SR, Spealman RD, Risner ME, Henningfield JE (1983) Control of behavior by intravenous nicotine injections in laboratory animals. Pharmacol Biochem Behav 19:1011-1020.

Gomez-Ruiz M, Hernandez M, de Miguel R, Ramos JA (2007) An overview on the biochemistry of the cannabinoid system. Mol Neurobiol 36:3-14.

Gomez R, Navarro M, Ferrer B, Trigo JM, Bilbao A, Del Arco I, Cippitelli A, Nava F, Piomelli D, Rodriguez de Fonseca F (2002) A peripheral mechanism for CB1 cannabinoid receptor-dependent modulation of feeding. J Neurosci 22:9612-9617.

Gong JP, Onaivi ES, Ishiguro H, Liu QR, Tagliaferro PA, Brusco A, Uhl GR (2006) Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. Brain Res 1071:10-23.

Gonsiorek W, Lunn C, Fan X, Narula S, Lundell D, Hipkin RW (2000) Endocannabinoid 2-arachidonyl glycerol is a full agonist through human type 2 cannabinoid receptor: antagonism by anandamide. Mol Pharmacol 57:1045-1050.

Gonzalez S, Cascio MG, Fernandez-Ruiz J, Fezza F, Di Marzo V, Ramos JA (2002) Changes in endocannabinoid contents in the brain of rats chronically exposed to nicotine, ethanol or cocaine. Brain Res 954:73-81.

Gotti C, Riganti L, Vailati S, Clementi F (2006) Brain neuronal nicotinic receptors as new targets for drug discovery. Curr Pharm Des 12:407-428.

Graveland GA, DiFiglia M (1985) The frequency and distribution of medium-sized neurons with indented nuclei in the primate and rodent neostriatum. Brain Res 327:307-311.

Griebel G, Stemmelin J, Scatton B (2005) Effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant in models of emotional reactivity in rodents. Biol Psychiatry 57:261-267.

Grueter BA, Gosnell HB, Olsen CM, Schramm-Sapyta NL, Nekrasova T, Landreth GE, Winder DG (2006) Extracellular-signal regulated kinase 1-dependent metabotropic glutamate receptor 5-induced long-

term depression in the bed nucleus of the stria terminalis is disrupted by cocaine administration. J Neurosci 26:3210-3219.
Guillem K, Vouillac C, Azar MR, Parsons LH, Koob GF, Cador M, Stinus L (2005) Monoamine oxidase inhibition dramatically increases the motivation to self-administer nicotine in rats. J Neurosci 25:8593-8600.
Guillem K, Vouillac C, Azar MR, Parsons LH, Koob GF, Cador M, Stinus L (2006) Monoamine oxidase A rather than monoamine oxidase B inhibition increases nicotine reinforcement in rats. Eur J Neurosci 24:3532-3540.
Haller J, Varga B, Ledent C, Freund TF (2004a) CB1 cannabinoid receptors mediate anxiolytic effects: convergent genetic and pharmacological evidence with CB1-specific agents. Behav Pharmacol 15:299-304.
Haller J, Bakos N, Szirmay M, Ledent C, Freund TF (2002) The effects of genetic and pharmacological blockade of the CB1 cannabinoid receptor on anxiety. Eur J Neurosci 16:1395-1398.
Haller J, Varga B, Ledent C, Barna I, Freund TF (2004b) Context-dependent effects of CB1 cannabinoid gene disruption on anxiety-like and social behaviour in mice. Eur J Neurosci 19:1906-1912.
Haller J, Barna I, Barsvari B, Gyimesi Pelczer K, Yasar S, Panlilio LV, Goldberg S (2009) Interactions between environmental aversiveness and the anxiolytic effects of enhanced cannabinoid signaling by FAAH inhibition in rats. Psychopharmacology (Berl) 204:607-616.
Haller J, Matyas F, Soproni K, Varga B, Barsy B, Nemeth B, Mikics E, Freund TF, Hajos N (2007) Correlated species differences in the effects of cannabinoid ligands on anxiety and on GABAergic and glutamatergic synaptic transmission. Eur J Neurosci 25:2445-2456.
Hansen HS (2010) Palmitoylethanolamide and other anandamide congeners. Proposed role in the diseased brain. Exp Neurol 224:48-55.
Hansson AC, Bermudez-Silva FJ, Malinen H, Hyytia P, Sanchez-Vera I, Rimondini R, Rodriguez de Fonseca F, Kunos G, Sommer WH, Heilig M (2007) Genetic impairment of frontocortical endocannabinoid degradation and high alcohol preference. Neuropsychopharmacology 32:117-126.
Hanus L, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, Kustanovich I, Mechoulam R (2001) 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. Proc Natl Acad Sci U S A 98:3662-3665.
Harvey DM, Yasar S, Heishman SJ, Panlilio LV, Henningfield JE, Goldberg SR (2004) Nicotine serves as an effective reinforcer of intravenous drug-taking behavior in human cigarette smokers. Psychopharmacology (Berl) 175:134-142.
Hayase T (2007) Chronologically overlapping occurrences of nicotine-induced anxiety- and depression-related behavioral symptoms: effects of anxiolytic and cannabinoid drugs. BMC Neurosci 8:76.
Hayase T (2008) Nicotine (NC)-induced "depressive" behavioral symptoms and effects of antidepressants including cannabinoids (CBs). J Toxicol Sci 33:555-564.
Heifets BD, Castillo PE (2009) Endocannabinoid signaling and long-term synaptic plasticity. Annu Rev Physiol 71:283-306.
Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC (1991) Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. J Neurosci 11:563-583.
Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC (1990) Cannabinoid receptor localization in brain. Proc Natl Acad Sci U S A 87:1932-1936.
Higgs HN, Glomset JA (1994) Identification of a phosphatidic acid-preferring phospholipase A1 from bovine brain and testis. Proc Natl Acad Sci U S A 91:9574-9578.
Hill JA, Jr., Zoli M, Bourgeois JP, Changeux JP (1993) Immunocytochemical localization of a neuronal nicotinic receptor: the beta 2-subunit. J Neurosci 13:1551-1568.
Hill MN, Gorzalka BB (2005) Is there a role for the endocannabinoid system in the etiology and treatment of melancholic depression? Behav Pharmacol 16:333-352.
Hill MN, Gorzalka BB (2009) The endocannabinoid system and the treatment of mood and anxiety disorders. CNS Neurol Disord Drug Targets 8:451-458.
Hill MN, McEwen BS (2010) Involvement of the endocannabinoid system in the neurobehavioural effects of stress and glucocorticoids. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 34:791-797.

Hill MN, Carrier EJ, McLaughlin RJ, Morrish AC, Meier SE, Hillard CJ, Gorzalka BB (2008) Regional alterations in the endocannabinoid system in an animal model of depression: effects of concurrent antidepressant treatment. J Neurochem 106:2322-2336.

Hill MN, McLaughlin RJ, Morrish AC, Viau V, Floresco SB, Hillard CJ, Gorzalka BB (2009) Suppression of amygdalar endocannabinoid signaling by stress contributes to activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Neuropsychopharmacology 34:2733-2745.

Hoffman AF, Lupica CR (2001) Direct actions of cannabinoids on synaptic transmission in the nucleus accumbens: a comparison with opioids. J Neurophysiol 85:72-83.

Hohmann AG, Herkenham M (1998) Regulation of cannabinoid and mu opioid receptors in rat lumbar spinal cord following neonatal capsaicin treatment. Neurosci Lett 252:13-16.

Hohmann AG, Herkenham M (1999) Localization of central cannabinoid CB1 receptor messenger RNA in neuronal subpopulations of rat dorsal root ganglia: a double-label in situ hybridization study. Neuroscience 90:923-931.

Houchi H, Babovic D, Pierrefiche O, Ledent C, Daoust M, Naassila M (2005) CB1 receptor knockout mice display reduced ethanol-induced conditioned place preference and increased striatal dopamine D2 receptors. Neuropsychopharmacology 30:339-349.

Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG (2002) International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. Pharmacol Rev 54:161-202.

Huang SM, Bisogno T, Trevisani M, Al-Hayani A, De Petrocellis L, Fezza F, Tognetto M, Petros TJ, Krey JF, Chu CJ, Miller JD, Davies SN, Geppetti P, Walker JM, Di Marzo V (2002) An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. Proc Natl Acad Sci U S A 99:8400-8405.

Huestis MA, Gorelick DA, Heishman SJ, Preston KL, Nelson RA, Moolchan ET, Frank RA (2001) Blockade of effects of smoked marijuana by the CB1-selective cannabinoid receptor antagonist SR141716. Arch Gen Psychiatry 58:322-328.

Hughes JR (2007) Effects of abstinence from tobacco: etiology, animal models, epidemiology, and significance: a subjective review. Nicotine Tob Res 9:329-339.

Hungund BL, Szakall I, Adam A, Basavarajappa BS, Vadasz C (2003) Cannabinoid CB1 receptor knockout mice exhibit markedly reduced voluntary alcohol consumption and lack alcohol-induced dopamine release in the nucleus accumbens. J Neurochem 84:698-704.

Jamshidi N, Taylor DA (2001) Anandamide administration into the ventromedial hypothalamus stimulates appetite in rats. Br J Pharmacol 134:1151-1154.

Jin Y, Yang K, Wang H, Wu J (2011) Exposure of nicotine to ventral tegmental area slices induces glutamatergic synaptic plasticity on dopamine neurons. Synapse 65:332-338.

Johnson SW, North RA (1992) Two types of neurone in the rat ventral tegmental area and their synaptic inputs. J Physiol 450:455-468.

Jones IW, Wonnacott S (2004) Precise localization of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors on glutamatergic axon terminals in the rat ventral tegmental area. J Neurosci 24:11244-11252.

Justinova Z, Yasar S, Redhi GH, Goldberg SR (2011) The endogenous cannabinoid 2-arachidonoylglycerol is intravenously self-administered by squirrel monkeys. J Neurosci 31:7043-7048.

Justinova Z, Mangieri RA, Bortolato M, Chefer SI, Mukhin AG, Clapper JR, King AR, Redhi GH, Yasar S, Piomelli D, Goldberg SR (2008) Fatty acid amide hydrolase inhibition heightens anandamide signaling without producing reinforcing effects in primates. Biol Psychiatry 64:930-937.

Kalivas PW, Nakamura M (1999) Neural systems for behavioral activation and reward. Curr Opin Neurobiol 9:223-227.

Kasckow JW, Mulchahey JJ, Geracioti TD, Jr. (2004) Effects of the vanilloid agonist olvanil and antagonist capsazepine on rat behaviors. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 28:291-295.

Kathuria S, Gaetani S, Fegley D, Valino F, Duranti A, Tontini A, Mor M, Tarzia G, La Rana G, Calignano A, Giustino A, Tattoli M, Palmery M, Cuomo V, Piomelli D (2003) Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. Nat Med 9:76-81.

Katona I, Urban GM, Wallace M, Ledent C, Jung KM, Piomelli D, Mackie K, Freund TF (2006) Molecular composition of the endocannabinoid system at glutamatergic synapses. J Neurosci 26:5628-5637.

Kawahara H, Drew GM, Christie MJ, Vaughan CW (2011) Inhibition of fatty acid amide hydrolase unmasks CB1 receptor and TRPV1 channel-mediated modulation of glutamatergic synaptic transmission in midbrain periaqueductal grey. Br J Pharmacol 163:1214-1222.

Kenny PJ, Markou A (2006) Nicotine self-administration acutely activates brain reward systems and induces a long-lasting increase in reward sensitivity. Neuropsychopharmacology 31:1203-1211.

Kirkham TC (2005) Endocannabinoids in the regulation of appetite and body weight. Behav Pharmacol 16:297-313.

Kirkham TC, Williams CM, Fezza F, Di Marzo V (2002) Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation to fasting, feeding and satiation: stimulation of eating by 2-arachidonoyl glycerol. Br J Pharmacol 136:550-557.

Klein TW, Newton CA, Friedman H (2001) Cannabinoids and the immune system. Pain Res Manag 6:95-101.

Klink R, de Kerchove d'Exaerde A, Zoli M, Changeux JP (2001) Molecular and physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors in the midbrain dopaminergic nuclei. J Neurosci 21:1452-1463.

Kodas E, Cohen C, Louis C, Griebel G (2007) Cortico-limbic circuitry for conditioned nicotine-seeking behavior in rats involves endocannabinoid signaling. Psychopharmacology (Berl) 194:161-171.

La Rana G, Russo R, Campolongo P, Bortolato M, Mangieri RA, Cuomo V, Iacono A, Raso GM, Meli R, Piomelli D, Calignano A (2006) Modulation of neuropathic and inflammatory pain by the endocannabinoid transport inhibitor AM404 [N-(4-hydroxyphenyl)-eicosa-5,8,11,14-tetraenamide]. J Pharmacol Exp Ther 317:1365-1371.

Lai A, Parameswaran N, Khwaja M, Whiteaker P, Lindstrom JM, Fan H, McIntosh JM, Grady SR, Quik M (2005) Long-term nicotine treatment decreases striatal alpha 6* nicotinic acetylcholine receptor sites and function in mice. Mol Pharmacol 67:1639-1647.

Lambert DM, Di Marzo V (1999) The palmitoylethanolamide and oleamide enigmas : are these two fatty acid amides cannabimimetic? Curr Med Chem 6:757-773.

Lan R, Liu Q, Fan P, Lin S, Fernando SR, McCallion D, Pertwee R, Makriyannis A (1999) Structure-activity relationships of pyrazole derivatives as cannabinoid receptor antagonists. J Med Chem 42:769-776.

Le Foll B, Goldberg SR (2004) Rimonabant, a CB1 antagonist, blocks nicotine-conditioned place preferences. Neuroreport 15:2139-2143.

Le Foll B, Wertheim C, Goldberg SR (2007) High reinforcing efficacy of nicotine in non-human primates. PLoS One 2:e230.

Le Foll B, Gorelick DA, Goldberg SR (2009) The future of endocannabinoid-oriented clinical research after CB1 antagonists. Psychopharmacology (Berl) 205:171-174.

Le Foll B, Forget B, Aubin HJ, Goldberg SR (2008) Blocking cannabinoid CB1 receptors for the treatment of nicotine dependence: insights from pre-clinical and clinical studies. Addict Biol 13:239-252.

Ledent C, Valverde O, Cossu G, Petitet F, Aubert JF, Beslot F, Bohme GA, Imperato A, Pedrazzini T, Roques BP, Vassart G, Fratta W, Parmentier M (1999) Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. Science 283:401-404.

LeSage MG, Burroughs D, Dufek M, Keyler DE, Pentel PR (2004) Reinstatement of nicotine self-administration in rats by presentation of nicotine-paired stimuli, but not nicotine priming. Pharmacol Biochem Behav 79:507-513.

Lesscher HM, Hoogveld E, Burbach JP, van Ree JM, Gerrits MA (2005) Endogenous cannabinoids are not involved in cocaine reinforcement and development of cocaine-induced behavioural sensitization. Eur Neuropsychopharmacol 15:31-37.

Lindblom N, de Villiers SH, Kalayanov G, Gordon S, Johansson AM, Svensson TH (2002) Active immunization against nicotine prevents reinstatement of nicotine-seeking behavior in rats. Respiration 69:254-260.

Liu L, Zhu W, Zhang ZS, Yang T, Grant A, Oxford G, Simon SA (2004) Nicotine inhibits voltage-dependent sodium channels and sensitizes vanilloid receptors. J Neurophysiol 91:1482-1491.

Liu X, Palmatier MI, Caggiula AR, Donny EC, Sved AF (2007) Reinforcement enhancing effect of nicotine and its attenuation by nicotinic antagonists in rats. Psychopharmacology (Berl) 194:463-473.

Liu YL, Connoley IP, Wilson CA, Stock MJ (2005) Effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 on oxygen consumption and soleus muscle glucose uptake in Lep(ob)/Lep(ob) mice. Int J Obes (Lond) 29:183-187.

Lo Verme J, Fu J, Astarita G, La Rana G, Russo R, Calignano A, Piomelli D (2005) The nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-alpha mediates the anti-inflammatory actions of palmitoylethanolamide. Mol Pharmacol 67:15-19.

Long JZ, Nomura DK, Cravatt BF (2009a) Characterization of monoacylglycerol lipase inhibition reveals differences in central and peripheral endocannabinoid metabolism. Chem Biol 16:744-753.

Long JZ, Li W, Booker L, Burston JJ, Kinsey SG, Schlosburg JE, Pavon FJ, Serrano AM, Selley DE, Parsons LH, Lichtman AH, Cravatt BF (2009b) Selective blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis produces cannabinoid behavioral effects. Nat Chem Biol 5:37-44.

Lupica CR, Riegel AC (2005) Endocannabinoid release from midbrain dopamine neurons: a potential substrate for cannabinoid receptor antagonist treatment of addiction. Neuropharmacology 48:1105-1116.

Lutz B (2002) Molecular biology of cannabinoid receptors. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 66:123-142.

Maccarrone M, Rossi S, Bari M, De Chiara V, Fezza F, Musella A, Gasperi V, Prosperetti C, Bernardi G, Finazzi-Agro A, Cravatt BF, Centonze D (2008) Anandamide inhibits metabolism and physiological actions of 2-arachidonoylglycerol in the striatum. Nat Neurosci 11:152-159.

Mackie K (2005) Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. Handb Exp Pharmacol:299-325.

Mackie K (2008) Cannabinoid receptors: where they are and what they do. J Neuroendocrinol 20 Suppl 1:10-14.

Mackie K, Stella N (2006) Cannabinoid receptors and endocannabinoids: evidence for new players. Aaps J 8:E298-306.

Maione S, De Petrocellis L, de Novellis V, Moriello AS, Petrosino S, Palazzo E, Rossi FS, Woodward DF, Di Marzo V (2007) Analgesic actions of N-arachidonoyl-serotonin, a fatty acid amide hydrolase inhibitor with antagonistic activity at vanilloid TRPV1 receptors. Br J Pharmacol 150:766-781.

Maldonado R, Berrendero F (2010) Endogenous cannabinoid and opioid systems and their role in nicotine addiction. Curr Drug Targets 11:440-449.

Maldonado R, Valverde O, Berrendero F (2006) Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction. Trends Neurosci 29:225-232.

Mannucci C, Navarra M, Pieratti A, Russo GA, Caputi AP, Calapai G (2011) Interactions between endocannabinoid and serotonergic systems in mood disorders caused by nicotine withdrawal. Nicotine Tob Res 13:239-247.

Mansour A, Khachaturian H, Lewis ME, Akil H, Watson SJ (1987) Autoradiographic differentiation of mu, delta, and kappa opioid receptors in the rat forebrain and midbrain. J Neurosci 7:2445-2464.

Mansvelder HD, McGehee DS (2002) Cellular and synaptic mechanisms of nicotine addiction. J Neurobiol 53:606-617.

Mansvelder HD, Keath JR, McGehee DS (2002) Synaptic mechanisms underlie nicotine-induced excitability of brain reward areas. Neuron 33:905-919.

Mansvelder HD, De Rover M, McGehee DS, Brussaard AB (2003) Cholinergic modulation of dopaminergic reward areas: upstream and downstream targets of nicotine addiction. Eur J Pharmacol 480:117-123.

Markou A (2008) Review. Neurobiology of nicotine dependence. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 363:3159-3168.

Marks MJ, Pauly JR, Gross SD, Deneris ES, Hermans-Borgmeyer I, Heinemann SF, Collins AC (1992) Nicotine binding and nicotinic receptor subunit RNA after chronic nicotine treatment. J Neurosci 12:2765-2784.

Marsch R, Foeller E, Rammes G, Bunck M, Kossl M, Holsboer F, Zieglgansberger W, Landgraf R, Lutz B, Wotjak CT (2007) Reduced anxiety, conditioned fear, and hippocampal long-term potentiation in transient receptor potential vanilloid type 1 receptor-deficient mice. J Neurosci 27:832-839.

Marsicano G, Lutz B (1999) Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. Eur J Neurosci 11:4213-4225.

Marsicano G, Wotjak CT, Azad SC, Bisogno T, Rammes G, Cascio MG, Hermann H, Tang J, Hofmann C, Zieglgansberger W, Di Marzo V, Lutz B (2002) The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. Nature 418:530-534.

Martellotta MC, Kuzmin A, Zvartau E, Cossu G, Gessa GL, Fratta W (1995) Isradipine inhibits nicotine intravenous self-administration in drug-naive mice. Pharmacol Biochem Behav 52:271-274.

Martin-Garcia E, Burokas A, Martin M, Berrendero F, Rubi B, Kiesselbach C, Heyne A, Gispert JD, Millan O, Maldonado R (2010) Central and peripheral consequences of the chronic blockade of CB1 cannabinoid receptor with rimonabant or taranabant. J Neurochem 112:1338-13351.

Martin BR, Compton DR, Little PJ, Martin TJ, Beardsley PM (1987) Pharmacological evaluation of agonistic and antagonistic activity of cannabinoids. NIDA Res Monogr 79:108-122.

Martin M, Ledent C, Parmentier M, Maldonado R, Valverde O (2000) Cocaine, but not morphine, induces conditioned place preference and sensitization to locomotor responses in CB1 knockout mice. Eur J Neurosci 12:4038-4046.

Martin M, Ledent C, Parmentier M, Maldonado R, Valverde O (2002) Involvement of CB1 cannabinoid receptors in emotional behaviour. Psychopharmacology (Berl) 159:379-387.

Mascia P, Pistis M, Justinova Z, Panlilio LV, Luchicchi A, Lecca S, Scherma M, Fratta W, Fadda P, Barnes C, Redhi GH, Yasar S, Le Foll B, Tanda G, Piomelli D, Goldberg SR (2011) Blockade of nicotine reward and reinstatement by activation of alpha-type peroxisome proliferator-activated receptors. Biol Psychiatry 69:633-641.

Maskos U, Molles BE, Pons S, Besson M, Guiard BP, Guilloux JP, Evrard A, Cazala P, Cormier A, Mameli-Engvall M, Dufour N, Cloez-Tayarani I, Bemelmans AP, Mallet J, Gardier AM, David V, Faure P, Granon S, Changeux JP (2005) Nicotine reinforcement and cognition restored by targeted expression of nicotinic receptors. Nature 436:103-107.

Massi L, Elezgarai I, Puente N, Reguero L, Grandes P, Manzoni OJ, Georges F (2008) Cannabinoid receptors in the bed nucleus of the stria terminalis control cortical excitation of midbrain dopamine cells in vivo. J Neurosci 28:10496-10508.

Matias I, Gonthier MP, Orlando P, Martiadis V, De Petrocellis L, Cervino C, Petrosino S, Hoareau L, Festy F, Pasquali R, Roche R, Maj M, Pagotto U, Monteleone P, Di Marzo V (2006) Regulation, function, and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and beta-pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. J Clin Endocrinol Metab 91:3171-3180.

Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. Nature 346:561-564.

McGehee DS, Heath MJ, Gelber S, Devay P, Role LW (1995) Nicotine enhancement of fast excitatory synaptic transmission in CNS by presynaptic receptors. Science 269:1692-1696.

McGregor IS, Gurtman CG, Morley KC, Clemens KJ, Blokland A, Li KM, Cornish JL, Hunt GE (2003) Increased anxiety and "depressive" symptoms months after MDMA ("ecstasy") in rats: drug-induced hyperthermia does not predict long-term outcomes. Psychopharmacology (Berl) 168:465-474.

Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, et al. (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. Biochem Pharmacol 50:83-90.

Melis M, Pistis M, Perra S, Muntoni AL, Pillolla G, Gessa GL (2004) Endocannabinoids mediate presynaptic inhibition of glutamatergic transmission in rat ventral tegmental area dopamine neurons through activation of CB1 receptors. J Neurosci 24:53-62.

Melis M, Pillolla G, Luchicchi A, Muntoni AL, Yasar S, Goldberg SR, Pistis M (2008) Endogenous fatty acid ethanolamides suppress nicotine-induced activation of mesolimbic dopamine neurons through nuclear receptors. J Neurosci 28:13985-13994.

Metaxas A, Bailey A, Barbano MF, Galeote L, Maldonado R, Kitchen I (2010) Differential region-specific regulation of alpha4beta2* nAChRs by self-administered and non-contingent nicotine in C57BL/6J mice. Addict Biol 15:464-479.

Micale V, Cristino L, Tamburella A, Petrosino S, Leggio GM, Drago F, Di Marzo V (2009) Anxiolytic effects in mice of a dual blocker of fatty acid amide hydrolase and transient receptor potential vanilloid type-1 channels. Neuropsychopharmacology 34:593-606.

Molander AC, Mar A, Norbury A, Steventon S, Moreno M, Caprioli D, Theobald DE, Belin D, Everitt BJ, Robbins TW, Dalley JW (2010) High impulsivity predicting vulnerability to cocaine addiction in rats: some relationship with novelty preference but not novelty reactivity, anxiety or stress. Psychopharmacology (Berl) 215:721-731.

Molander L, Lunell E, Fagerstrom KO (2000) Reduction of tobacco withdrawal symptoms with a sublingual nicotine tablet: a placebo controlled study. Nicotine Tob Res 2:187-191.

Monory K, Blaudzun H, Massa F, Kaiser N, Lemberger T, Schutz G, Wotjak CT, Lutz B, Marsicano G (2007) Genetic dissection of behavioural and autonomic effects of Delta(9)-tetrahydrocannabinol in mice. PLoS Biol 5:e269.

Moreira FA, Crippa JA (2009) The psychiatric side-effects of rimonabant. Rev Bras Psiquiatr 31:145-153.

Moreira FA, Kaiser N, Monory K, Lutz B (2008) Reduced anxiety-like behaviour induced by genetic and pharmacological inhibition of the endocannabinoid-degrading enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH) is mediated by CB1 receptors. Neuropharmacology 54:141-150.

Moreno S, Farioli-Vecchioli S, Ceru MP (2004) Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS. Neuroscience 123:131-145.

Morgan NH, Stanford IM, Woodhall GL (2009) Functional CB2 type cannabinoid receptors at CNS synapses. Neuropharmacology 57:356-368.

Muccioli GG (2010) Endocannabinoid biosynthesis and inactivation, from simple to complex. Drug Discov Today 15:474-483.

Mugnaini M, Garzotti M, Sartori I, Pilla M, Repeto P, Heidbreder CA, Tessari M (2006) Selective down-regulation of [(125)I]Y0-alpha-conotoxin MII binding in rat mesostriatal dopamine pathway following continuous infusion of nicotine. Neuroscience 137:565-572.

Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. Nature 365:61-65.

Naderi N, Haghparast A, Saber-Tehrani A, Rezaii N, Alizadeh AM, Khani A, Motamedi F (2008) Interaction between cannabinoid compounds and diazepam on anxiety-like behaviour of mice. Pharmacol Biochem Behav 89:64-75.

Naidu PS, Varvel SA, Ahn K, Cravatt BF, Martin BR, Lichtman AH (2007) Evaluation of fatty acid amide hydrolase inhibition in murine models of emotionality. Psychopharmacology (Berl) 192:61-70.

Nashmi R, Xiao C, Deshpande P, McKinney S, Grady SR, Whiteaker P, Huang Q, McClure-Begley T, Lindstrom JM, Labarca C, Collins AC, Marks MJ, Lester HA (2007) Chronic nicotine cell specifically upregulates functional alpha 4* nicotinic receptors: basis for both tolerance in midbrain and enhanced long-term potentiation in perforant path. J Neurosci 27:8202-8218.

Nathan PJ, O'Neill BV, Napolitano A, Bullmore ET (2011) Neuropsychiatric adverse effects of centrally acting antiobesity drugs. CNS Neurosci Ther 17:490-505.

Navarrete M, Araque A (2008) Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication. Neuron 57:883-893.

Navarro M, Hernandez E, Munoz RM, del Arco I, Villanua MA, Carrera MR, Rodriguez de Fonseca F (1997) Acute administration of the CB1 cannabinoid receptor antagonist SR 141716A induces anxiety-like responses in the rat. Neuroreport 8:491-496.

Navarro M, Carrera MR, Fratta W, Valverde O, Cossu G, Fattore L, Chowen JA, Gomez R, del Arco I, Villanua MA, Maldonado R, Koob GF, Rodriguez de Fonseca F (2001) Functional interaction between opioid and cannabinoid receptors in drug self-administration. J Neurosci 21:5344-5350.

Nguyen HN, Rasmussen BA, Perry DC (2004) Binding and functional activity of nicotinic cholinergic receptors in selected rat brain regions are increased following long-term but not short-term nicotine treatment. J Neurochem 90:40-49.

Nissen SE, Nicholls SJ, Wolski K, Rodes-Cabau J, Cannon CP, Deanfield JE, Despres JP, Kastelein JJ, Steinhubl SR, Kapadia S, Yasin M, Ruzyllo W, Gaudin C, Job B, Hu B, Bhatt DL, Lincoff AM, Tuzcu EM (2008) Effect of rimonabant on progression of atherosclerosis in patients with abdominal obesity and coronary artery disease: the STRADIVARIUS randomized controlled trial. Jama 299:1547-1560.

O'Connor EC, Chapman K, Butler P, Mead AN (2011) The predictive validity of the rat self-administration model for abuse liability. Neurosci Biobehav Rev 35:912-938.

O'Sullivan SE (2007) Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. Br J Pharmacol 152:576-582.

Omelchenko N, Sesack SR (2009) Ultrastructural analysis of local collaterals of rat ventral tegmental area neurons: GABA phenotype and synapses onto dopamine and GABA cells. Synapse 63:895-906.

Onaivi ES, Ishiguro H, Gong JP, Patel S, Meozzi PA, Myers L, Perchuk A, Mora Z, Tagliaferro PA, Gardner E, Brusco A, Akinshola BE, Liu QR, Chirwa SS, Hope B, Lujilde J, Inada T, Iwasaki S, Macharia D, Teasenfitz L, Arinami T, Uhl GR (2008) Functional expression of brain neuronal CB2 cannabinoid receptors are involved in the effects of drugs of abuse and in depression. Ann N Y Acad Sci 1139:434-449.

Overton HA, Babbs AJ, Doel SM, Fyfe MC, Gardner LS, Griffin G, Jackson HC, Procter MJ, Rasamison CM, Tang-Christensen M, Widdowson PS, Williams GM, Reynet C (2006) Deorphanization of a G protein-coupled receptor for oleoylethanolamide and its use in the discovery of small-molecule hypophagic agents. Cell Metab 3:167-175.

Pacher P, Batkai S, Kunos G (2004) Haemodynamic profile and responsiveness to anandamide of TRPV1 receptor knock-out mice. J Physiol 558:647-657.

Pagotto U, Marsicano G, Cota D, Lutz B, Pasquali R (2006) The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. Endocr Rev 27:73-100.

Papp M, Willner P, Muscat R (1991) An animal model of anhedonia: attenuation of sucrose consumption and place preference conditioning by chronic unpredictable mild stress. Psychopharmacology (Berl) 104:255-259.

Parker SL, Fu Y, McAllen K, Luo J, McIntosh JM, Lindstrom JM, Sharp BM (2004) Up-regulation of brain nicotinic acetylcholine receptors in the rat during long-term self-administration of nicotine: disproportionate increase of the alpha6 subunit. Mol Pharmacol 65:611-622.

Patel S, Hillard CJ (2006) Pharmacological evaluation of cannabinoid receptor ligands in a mouse model of anxiety: further evidence for an anxiolytic role for endogenous cannabinoid signaling. J Pharmacol Exp Ther 318:304-311.

Patel S, Cravatt BF, Hillard CJ (2005a) Synergistic interactions between cannabinoids and environmental stress in the activation of the central amygdala. Neuropsychopharmacology 30:497-507.

Patel S, Roelke CT, Rademacher DJ, Hillard CJ (2005b) Inhibition of restraint stress-induced neural and behavioural activation by endogenous cannabinoid signalling. Eur J Neurosci 21:1057-1069.

Paterson NE, Markou A (2003) Increased motivation for self-administered cocaine after escalated cocaine intake. Neuroreport 14:2229-2232.

Paterson NE, Markou A (2004) Prolonged nicotine dependence associated with extended access to nicotine self-administration in rats. Psychopharmacology (Berl) 173:64-72.

Perra S, Pillolla G, Melis M, Muntoni AL, Gessa GL, Pistis M (2005) Involvement of the endogenous cannabinoid system in the effects of alcohol in the mesolimbic reward circuit: electrophysiological evidence in vivo. Psychopharmacology (Berl) 183:368-377.

Perry DC, Davila-Garcia MI, Stockmeier CA, Kellar KJ (1999) Increased nicotinic receptors in brains from smokers: membrane binding and autoradiography studies. J Pharmacol Exp Ther 289:1545-1552.

Pertwee RG (1997) Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. Pharmacol Ther 74:129-180.

Pertwee RG (2001) Cannabinoid receptors and pain. Prog Neurobiol 63:569-611.

Pertwee RG (2008) Ligands that target cannabinoid receptors in the brain: from THC to anandamide and beyond. Addict Biol 13:147-159.

Phillips PE, Stuber GD, Heien ML, Wightman RM, Carelli RM (2003) Subsecond dopamine release promotes cocaine seeking. Nature 422:614-618.

Pi-Sunyer FX, Aronne LJ, Heshmati HM, Devin J, Rosenstock J (2006) Effect of rimonabant, a cannabinoid-1 receptor blocker, on weight and cardiometabolic risk factors in overweight or obese patients: RIO-North America: a randomized controlled trial. Jama 295:761-775.

Picciotto MR, Corrigall WA (2002) Neuronal systems underlying behaviors related to nicotine addiction: neural circuits and molecular genetics. J Neurosci 22:3338-3341.

Picciotto MR, Caldarone BJ, King SL, Zachariou V (2000) Nicotinic receptors in the brain. Links between molecular biology and behavior. Neuropsychopharmacology 22:451-465.

Picciotto MR, Zoli M, Rimondini R, Lena C, Marubio LM, Pich EM, Fuxe K, Changeux JP (1998) Acetylcholine receptors containing the beta2 subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine. Nature 391:173-177.

Pickel VM, Chan J, Kash TL, Rodriguez JJ, MacKie K (2004) Compartment-specific localization of cannabinoid 1 (CB1) and mu-opioid receptors in rat nucleus accumbens. Neuroscience 127:101-112.

Pidoplichko VI, Noguchi J, Areola OO, Liang Y, Peterson J, Zhang T, Dani JA (2004) Nicotinic cholinergic synaptic mechanisms in the ventral tegmental area contribute to nicotine addiction. Learn Mem 11:60-69.

Piomelli D (2003) The molecular logic of endocannabinoid signalling. Nat Rev Neurosci 4:873-884.

Piomelli D, Tarzia G, Duranti A, Tontini A, Mor M, Compton TR, Dasse O, Monaghan EP, Parrott JA, Putman D (2006) Pharmacological profile of the selective FAAH inhibitor KDS-4103 (URB597). CNS Drug Rev 12:21-38.

Pons S, Fattore L, Cossu G, Tolu S, Porcu E, McIntosh JM, Changeux JP, Maskos U, Fratta W (2008) Crucial role of alpha4 and alpha6 nicotinic acetylcholine receptor subunits from ventral tegmental area in systemic nicotine self-administration. J Neurosci 28:12318-12327.

Pontieri FE, Tanda G, Orzi F, Di Chiara G (1996) Effects of nicotine on the nucleus accumbens and similarity to those of addictive drugs. Nature 382:255-257.

Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M (1977) Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. Nature 266:730-732.

Porter AC, Sauer JM, Knierman MD, Becker GW, Berna MJ, Bao J, Nomikos GG, Carter P, Bymaster FP, Leese AB, Felder CC (2002) Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. J Pharmacol Exp Ther 301:1020-1024.

Pothion S, Bizot JC, Trovero F, Belzung C (2004) Strain differences in sucrose preference and in the consequences of unpredictable chronic mild stress. Behav Brain Res 155:135-146.

Pryor GT, Larsen FF, Husain S, Braude MC (1978) Interactions of delta9-tetrahydrocannabinol with d-amphetamine, cocaine, and nicotine in rats. Pharmacol Biochem Behav 8:295-318.

Puente N, Elezgarai I, Lafourcade M, Reguero L, Marsicano G, Georges F, Manzoni OJ, Grandes P (2010) Localization and function of the cannabinoid CB1 receptor in the anterolateral bed nucleus of the stria terminalis. PLoS One 5:e8869.

Rademacher DJ, Meier SE, Shi L, Ho WS, Jarrahian A, Hillard CJ (2008) Effects of acute and repeated restraint stress on endocannabinoid content in the amygdala, ventral striatum, and medial prefrontal cortex in mice. Neuropharmacology 54:108-116.

Raiff BR, Dallery J (2009) Responding maintained by primary reinforcing visual stimuli is increased by nicotine administration in rats. Behav Processes 82:95-99.

Rasmussen BA, Perry DC (2006) An autoradiographic analysis of [125I]alpha-bungarotoxin binding in rat brain after chronic nicotine exposure. Neurosci Lett 404:9-14.

Ravinet Trillou C, Arnone M, Delgorge C, Gonalons N, Keane P, Maffrand JP, Soubrie P (2003) Anti-obesity effect of SR141716, a CB1 receptor antagonist, in diet-induced obese mice. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 284:R345-353.

Realini N, Vigano D, Guidali C, Zamberletti E, Rubino T, Parolaro D (2011) Chronic URB597 treatment at adulthood reverted most depressive-like symptoms induced by adolescent exposure to THC in female rats. Neuropharmacology 60:235-243.

Reibaud M, Obinu MC, Ledent C, Parmentier M, Bohme GA, Imperato A (1999) Enhancement of memory in cannabinoid CB1 receptor knock-out mice. Eur J Pharmacol 379:R1-2.

Reilly D, Didcott P, Swift W, Hall W (1998) Long-term cannabis use: characteristics of users in an Australian rural area. Addiction 93:837-846.

Rezvanfard M, Ekhtiari H, Mokri A, Djavid GE, Kaviani H (2010) Psychological and behavioral traits in smokers and their relationship with nicotine dependence level. Arch Iran Med 13:395-405.

Riegel AC, Lupica CR (2004) Independent presynaptic and postsynaptic mechanisms regulate endocannabinoid signaling at multiple synapses in the ventral tegmental area. J Neurosci 24:11070-11078.

Rinaldi-Carmona M, Barth F, Heaulme M, Shire D, Calandra B, Congy C, Martinez S, Maruani J, Neliat G, Caput D, et al. (1994) SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. FEBS Lett 350:240-244.

Robbe D, Kopf M, Remaury A, Bockaert J, Manzoni OJ (2002) Endogenous cannabinoids mediate long-term synaptic depression in the nucleus accumbens. Proc Natl Acad Sci U S A 99:8384-8388.

Rodriguez de Fonseca F, Carrera MR, Navarro M, Koob GF, Weiss F (1997) Activation of corticotropin-releasing factor in the limbic system during cannabinoid withdrawal. Science 276:2050-2054.

Rodriguez de Fonseca F, Navarro M, Gomez R, Escuredo L, Nava F, Fu J, Murillo-Rodriguez E, Giuffrida A, LoVerme J, Gaetani S, Kathuria S, Gall C, Piomelli D (2001) An anorexic lipid mediator regulated by feeding. Nature 414:209-212.

Rodriguez JJ, Mackie K, Pickel VM (2001) Ultrastructural localization of the CB1 cannabinoid receptor in mu-opioid receptor patches of the rat Caudate putamen nucleus. J Neurosci 21:823-833.

Rohleder N, Kirschbaum C (2006) The hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis in habitual smokers. Int J Psychophysiol 59:236-243.

Ross S, Peselow E (2009) The neurobiology of addictive disorders. Clin Neuropharmacol 32:269-276.

Rubino T, Vigano D, Costa B, Colleoni M, Parolaro D (2000) Loss of cannabinoid-stimulated guanosine 5'-O-(3-[(35)S]Thiotriphosphate) binding without receptor down-regulation in brain regions of anandamide-tolerant rats. J Neurochem 75:2478-2484.

Rubino T, Realini N, Braida D, Alberio T, Capurro V, Vigano D, Guidali C, Sala M, Fasano M, Parolaro D (2009) The depressive phenotype induced in adult female rats by adolescent exposure to THC is associated with cognitive impairment and altered neuroplasticity in the prefrontal cortex. Neurotox Res 15:291-302.

Rubino T, Realini N, Castiglioni C, Guidali C, Vigano D, Marras E, Petrosino S, Perletti G, Maccarrone M, Di Marzo V, Parolaro D (2008a) Role in anxiety behavior of the endocannabinoid system in the prefrontal cortex. Cereb Cortex 18:1292-1301.

Rubino T, Vigano D, Realini N, Guidali C, Braida D, Capurro V, Castiglioni C, Cherubino F, Romualdi P, Candeletti S, Sala M, Parolaro D (2008b) Chronic delta 9-tetrahydrocannabinol during adolescence provokes sex-dependent changes in the emotional profile in adult rats: behavioral and biochemical correlates. Neuropsychopharmacology 33:2760-2771.

Rucker D, Padwal R, Li SK, Curioni C, Lau DC (2007) Long term pharmacotherapy for obesity and overweight: updated meta-analysis. Bmj 335:1194-1199.

Rueda-Orozco PE, Montes-Rodriguez CJ, Soria-Gomez E, Mendez-Diaz M, Prospero-Garcia O (2008) Impairment of endocannabinoids activity in the dorsolateral striatum delays extinction of behavior in a procedural memory task in rats. Neuropharmacology 55:55-62.

Ryberg E, Larsson N, Sjogren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T, Greasley PJ (2007) The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. Br J Pharmacol 152:1092-1101.

Sanudo-Pena MC, Strangman NM, Mackie K, Walker JM, Tsou K (1999) CB1 receptor localization in rat spinal cord and roots, dorsal root ganglion, and peripheral nerve. Zhongguo Yao Li Xue Bao 20:1115-1120.

Sargent PB (1993) The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Annu Rev Neurosci 16:403-443.

Schatz AR, Lee M, Condie RB, Pulaski JT, Kaminski NE (1997) Cannabinoid receptors CB1 and CB2: a characterization of expression and adenylate cyclase modulation within the immune system. Toxicol Appl Pharmacol 142:278-287.

Scheen AJ, Finer N, Hollander P, Jensen MD, Van Gaal LF (2006) Efficacy and tolerability of rimonabant in overweight or obese patients with type 2 diabetes: a randomised controlled study. Lancet 368:1660-1672.

Scherma M, Fadda P, Le Foll B, Forget B, Fratta W, Goldberg SR, Tanda G (2008a) The endocannabinoid system: a new molecular target for the treatment of tobacco addiction. CNS Neurol Disord Drug Targets 7:468-481.

Scherma M, Medalie J, Fratta W, Vadivel SK, Makriyannis A, Piomelli D, Mikics E, Haller J, Yasar S, Tanda G, Goldberg SR (2008b) The endogenous cannabinoid anandamide has effects on motivation and

anxiety that are revealed by fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibition. Neuropharmacology 54:129-140.

Scherma M, Justinova Z, Zanettini C, Panlilio LV, Mascia P, Fadda P, Fratta W, Makriyannis A, Vadivel SK, Gamaleddin I, Le Foll B, Goldberg SR (2011) The anandamide transport inhibitor AM404 reduces the rewarding effects of nicotine and nicotine-induced dopamine elevations in the nucleus accumbens shell in rats. Br J Pharmacol.

Scherma M, Panlilio LV, Fadda P, Fattore L, Gamaleddin I, Le Foll B, Justinova Z, Mikics E, Haller J, Medalie J, Stroik J, Barnes C, Yasar S, Tanda G, Piomelli D, Fratta W, Goldberg SR (2008c) Inhibition of anandamide hydrolysis by cyclohexyl carbamic acid 3'-carbamoyl-3-yl ester (URB597) reverses abuse-related behavioral and neurochemical effects of nicotine in rats. J Pharmacol Exp Ther 327:482-490.

Schilstrom B, Rawal N, Mameli-Engvall M, Nomikos GG, Svensson TH (2003) Dual effects of nicotine on dopamine neurons mediated by different nicotinic receptor subtypes. Int J Neuropsychopharmacol 6:1-11.

Schlosburg JE, Blankman JL, Long JZ, Nomura DK, Pan B, Kinsey SG, Nguyen PT, Ramesh D, Booker L, Burston JJ, Thomas EA, Selley DE, Sim-Selley LJ, Liu QS, Lichtman AH, Cravatt BF (2010) Chronic monoacylglycerol lipase blockade causes functional antagonism of the endocannabinoid system. Nat Neurosci 13:1113-1119.

Schneider NG, Jarvik ME, Forsythe AB (1984) Nicotine vs. placebo gum in the alleviation of withdrawal during smoking cessation. Addict Behav 9:149-156.

Sciolino NR, Zhou W, Hohmann AG (2011) Enhancement of endocannabinoid signaling with JZL184, an inhibitor of the 2-arachidonoylglycerol hydrolyzing enzyme monoacylglycerol lipase, produces anxiolytic effects under conditions of high environmental aversiveness in rats. Pharmacol Res 64:226-234.

Seguela P, Wadiche J, Dineley-Miller K, Dani JA, Patrick JW (1993) Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. J Neurosci 13:596-604.

Seillier A, Giuffrida A (2011) Inhibition of fatty acid amide hydrolase modulates anxiety-like behavior in PCP-treated rats. Pharmacol Biochem Behav 98:583-586.

Shoaib M (2008) The cannabinoid antagonist AM251 attenuates nicotine self-administration and nicotine-seeking behaviour in rats. Neuropharmacology 54:438-444.

Shoaib M, Stolerman IP (1999) Plasma nicotine and cotinine levels following intravenous nicotine self-administration in rats. Psychopharmacology (Berl) 143:318-321.

Shoaib M, Schindler CW, Goldberg SR (1997) Nicotine self-administration in rats: strain and nicotine pre-exposure effects on acquisition. Psychopharmacology (Berl) 129:35-43.

Shram MJ, Funk D, Li Z, Le AD (2008) Nicotine self-administration, extinction responding and reinstatement in adolescent and adult male rats: evidence against a biological vulnerability to nicotine addiction during adolescence. Neuropsychopharmacology 33:739-748.

Sim-Selley LJ (2003) Regulation of cannabinoid CB1 receptors in the central nervous system by chronic cannabinoids. Crit Rev Neurobiol 15:91-119.

Skaper SD, Buriani A, Dal Toso R, Petrelli L, Romanello S, Facci L, Leon A (1996) The ALIAmide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons. Proc Natl Acad Sci U S A 93:3984-3989.

Smart D, Jerman JC (2000) Anandamide: an endogenous activator of the vanilloid receptor. Trends Pharmacol Sci 21:134.

Sofuoglu M, Yoo S, Hill KP, Mooney M (2008) Self-administration of intravenous nicotine in male and female cigarette smokers. Neuropsychopharmacology 33:715-720.

Solinas M, Yasar S, Goldberg SR (2007) Endocannabinoid system involvement in brain reward processes related to drug abuse. Pharmacol Res 56:393-405.

Solinas M, Panlilio LV, Antoniou K, Pappas LA, Goldberg SR (2003) The cannabinoid CB1 antagonist N-piperidinyl-5-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl) -4-methylpyrazole-3-carboxamide (SR-141716A) differentially alters the reinforcing effects of heroin under continuous reinforcement, fixed

ratio, and progressive ratio schedules of drug self-administration in rats. J Pharmacol Exp Ther 306:93-102.
Soria-Gomez E, Matias I, Rueda-Orozco PE, Cisneros M, Petrosino S, Navarro L, Di Marzo V, Prospero-Garcia O (2007) Pharmacological enhancement of the endocannabinoid system in the nucleus accumbens shell stimulates food intake and increases c-Fos expression in the hypothalamus. Br J Pharmacol 151:1109-1116.
Soria G, Mendizabal V, Tourino C, Robledo P, Ledent C, Parmentier M, Maldonado R, Valverde O (2005) Lack of CB1 cannabinoid receptor impairs cocaine self-administration. Neuropsychopharmacology 30:1670-1680.
Spivak CE, Lupica CR, Oz M (2007) The endocannabinoid anandamide inhibits the function of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors. Mol Pharmacol 72:1024-1032.
Staley JK, Krishnan-Sarin S, Cosgrove KP, Krantzler E, Frohlich E, Perry E, Dubin JA, Estok K, Brenner E, Baldwin RM, Tamagnan GD, Seibyl JP, Jatlow P, Picciotto MR, London ED, O'Malley S, van Dyck CH (2006) Human tobacco smokers in early abstinence have higher levels of beta2* nicotinic acetylcholine receptors than nonsmokers. J Neurosci 26:8707-8714.
Starowicz K, Nigam S, Di Marzo V (2007a) Biochemistry and pharmacology of endovanilloids. Pharmacol Ther 114:13-33.
Starowicz K, Maione S, Cristino L, Palazzo E, Marabese I, Rossi F, de Novellis V, Di Marzo V (2007b) Tonic endovanilloid facilitation of glutamate release in brainstem descending antinociceptive pathways. J Neurosci 27:13739-13749.
Steiner MA, Marsicano G, Nestler EJ, Holsboer F, Lutz B, Wotjak CT (2008a) Antidepressant-like behavioral effects of impaired cannabinoid receptor type 1 signaling coincide with exaggerated corticosterone secretion in mice. Psychoneuroendocrinology 33:54-67.
Steiner MA, Wanisch K, Monory K, Marsicano G, Borroni E, Bachli H, Holsboer F, Lutz B, Wotjak CT (2008b) Impaired cannabinoid receptor type 1 signaling interferes with stress-coping behavior in mice. Pharmacogenomics J 8:196-208.
Stella N, Schweitzer P, Piomelli D (1997) A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. Nature 388:773-778.
Stolerman IP (1999) Inter-species consistency in the behavioural pharmacology of nicotine dependence. Behav Pharmacol 10:559-580.
Stolerman IP, Jarvis MJ (1995) The scientific case that nicotine is addictive. Psychopharmacology (Berl) 117:2-10; discussion 14-20.
Stolerman IP, Naylor C, Elmer GI, Goldberg SR (1999) Discrimination and self-administration of nicotine by inbred strains of mice. Psychopharmacology (Berl) 141:297-306.
Stolerman IP, Chamberlain S, Bizarro L, Fernandes C, Schalkwyk L (2004) The role of nicotinic receptor alpha 7 subunits in nicotine discrimination. Neuropharmacology 46:363-371.
Suardiaz M, Estivill-Torrus G, Goicoechea C, Bilbao A, Rodriguez de Fonseca F (2007) Analgesic properties of oleoylethanolamide (OEA) in visceral and inflammatory pain. Pain 133:99-110.
Suarez J, Rivera P, Llorente R, Romero-Zerbo SY, Bermudez-Silva FJ, de Fonseca FR, Viveros MP (2010) Early maternal deprivation induces changes on the expression of 2-AG biosynthesis and degradation enzymes in neonatal rat hippocampus. Brain Res 1349:162-173.
Sugiura T, Waku K (2000) 2-arachidonoylglycerol: a possible multifunctional lipid mediator in the nervous and immune systems. Ann N Y Acad Sci 905:344-346.
Sugiura T, Kishimoto S, Oka S, Gokoh M (2006) Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. Prog Lipid Res 45:405-446.
Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K (1995) 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. Biochem Biophys Res Commun 215:89-97.
Sugiura T, Kodaka T, Nakane S, Miyashita T, Kondo S, Suhara Y, Takayama H, Waku K, Seki C, Baba N, Ishima Y (1999) Evidence that the cannabinoid CB1 receptor is a 2-arachidonoylglycerol receptor. Structure-activity relationship of 2-arachidonoylglycerol, ether-linked analogues, and related compounds. J Biol Chem 274:2794-2801.

Sutt S, Raud S, Areda T, Reimets A, Koks S, Vasar E (2008) Cat odour-induced anxiety--a study of the involvement of the endocannabinoid system. Psychopharmacology (Berl) 198:509-520.

Szabo B, Siemes S, Wallmichrath I (2002) Inhibition of GABAergic neurotransmission in the ventral tegmental area by cannabinoids. Eur J Neurosci 15:2057-2061.

Tanimura A, Yamazaki M, Hashimotodani Y, Uchigashima M, Kawata S, Abe M, Kita Y, Hashimoto K, Shimizu T, Watanabe M, Sakimura K, Kano M (2010) The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol produced by diacylglycerol lipase alpha mediates retrograde suppression of synaptic transmission. Neuron 65:320-327.

Tanti A, Belzung C (2010) Open questions in current models of antidepressant action. Br J Pharmacol 159:1187-1200.

Tapper AR, McKinney SL, Nashmi R, Schwarz J, Deshpande P, Labarca C, Whiteaker P, Marks MJ, Collins AC, Lester HA (2004) Nicotine activation of alpha4* receptors: sufficient for reward, tolerance, and sensitization. Science 306:1029-1032.

Terzian AL, Aguiar DC, Guimaraes FS, Moreira FA (2009) Modulation of anxiety-like behaviour by Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 (TRPV1) channels located in the dorsolateral periaqueductal gray. Eur Neuropsychopharmacol 19:188-195.

Tessari M, Valerio E, Chiamulera C, Beardsley PM (1995) Nicotine reinforcement in rats with histories of cocaine self-administration. Psychopharmacology (Berl) 121:282-283.

Thanos PK, Dimitrakakis ES, Rice O, Gifford A, Volkow ND (2005) Ethanol self-administration and ethanol conditioned place preference are reduced in mice lacking cannabinoid CB1 receptors. Behav Brain Res 164:206-213.

Tsuboi K, Takezaki N, Ueda N (2007) The N-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase (NAAA). Chem Biodivers 4:1914-1925.

Turner JR, Kellar KJ (2005) Nicotinic cholinergic receptors in the rat cerebellum: multiple heteromeric subtypes. J Neurosci 25:9258-9265.

Uchigashima M, Narushima M, Fukaya M, Katona I, Kano M, Watanabe M (2007) Subcellular arrangement of molecules for 2-arachidonoyl-glycerol-mediated retrograde signaling and its physiological contribution to synaptic modulation in the striatum. J Neurosci 27:3663-3676.

Uriguen L, Perez-Rial S, Ledent C, Palomo T, Manzanares J (2004) Impaired action of anxiolytic drugs in mice deficient in cannabinoid CB1 receptors. Neuropharmacology 46:966-973.

Valentine JD, Hokanson JS, Matta SG, Sharp BM (1997) Self-administration in rats allowed unlimited access to nicotine. Psychopharmacology (Berl) 133:300-304.

Valjent E, Mitchell JM, Besson MJ, Caboche J, Maldonado R (2002) Behavioural and biochemical evidence for interactions between Delta 9-tetrahydrocannabinol and nicotine. Br J Pharmacol 135:564-578.

van der Stelt M, Mazzola C, Esposito G, Matias I, Petrosino S, De Filippis D, Micale V, Steardo L, Drago F, Iuvone T, Di Marzo V (2006) Endocannabinoids and beta-amyloid-induced neurotoxicity in vivo: effect of pharmacological elevation of endocannabinoid levels. Cell Mol Life Sci 63:1410-1424.

Van Gaal LF, Rissanen AM, Scheen AJ, Ziegler O, Rossner S (2005) Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study. Lancet 365:1389-1397.

Van Gaal LF, Scheen AJ, Rissanen AM, Rossner S, Hanotin C, Ziegler O (2008) Long-term effect of CB1 blockade with rimonabant on cardiometabolic risk factors: two year results from the RIO-Europe Study. Eur Heart J 29:1761-1771.

Varvel SA, Wise LE, Niyuhire F, Cravatt BF, Lichtman AH (2007) Inhibition of fatty-acid amide hydrolase accelerates acquisition and extinction rates in a spatial memory task. Neuropsychopharmacology 32:1032-1041.

Varvel SA, Bridgen DT, Tao Q, Thomas BF, Martin BR, Lichtman AH (2005) Delta9-tetrahydrocannbinol accounts for the antinociceptive, hypothermic, and cataleptic effects of marijuana in mice. J Pharmacol Exp Ther 314:329-337.

Verty AN, McGregor IS, Mallet PE (2005) Paraventricular hypothalamic CB(1) cannabinoid receptors are involved in the feeding stimulatory effects of Delta(9)-tetrahydrocannabinol. Neuropharmacology 49:1101-1109.

Vigano D, Rubino T, Parolaro D (2005) Molecular and cellular basis of cannabinoid and opioid interactions. Pharmacol Biochem Behav 81:360-368.
Vigano D, Grazia Cascio M, Rubino T, Fezza F, Vaccani A, Di Marzo V, Parolaro D (2003) Chronic morphine modulates the contents of the endocannabinoid, 2-arachidonoyl glycerol, in rat brain. Neuropsychopharmacology 28:1160-1167.
Villares J (2007) Chronic use of marijuana decreases cannabinoid receptor binding and mRNA expression in the human brain. Neuroscience 145:323-334.
Vriens J, Appendino G, Nilius B (2009) Pharmacology of vanilloid transient receptor potential cation channels. Mol Pharmacol 75:1262-1279.
Wakasa Y, Takada K, Yanagita T (1995) Reinforcing effect as a function of infusion speed in intravenous self-administration of nicotine in rhesus monkeys. Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi 15:53-59.
Walters CL, Brown S, Changeux JP, Martin B, Damaj MI (2006) The beta2 but not alpha7 subunit of the nicotinic acetylcholine receptor is required for nicotine-conditioned place preference in mice. Psychopharmacology (Berl) 184:339-344.
Ward SJ, Rosenberg M, Dykstra LA, Walker EA (2009) The CB1 antagonist rimonabant (SR141716) blocks cue-induced reinstatement of cocaine seeking and other context and extinction phenomena predictive of relapse. Drug Alcohol Depend 105:248-255.
Weill CL, McNamee MG, Karlin A (1974) Affinity-labeling of purified acetylcholine receptor from Torpedo californica. Biochem Biophys Res Commun 61:997-1003.
Werling LL, Reed SC, Wade D, Izenwasser S (2009) Chronic nicotine alters cannabinoid-mediated locomotor activity and receptor density in periadolescent but not adult male rats. Int J Dev Neurosci 27:263-269.
Wilson RI, Nicoll RA (2002) Endocannabinoid signaling in the brain. Science 296:678-682.
Winternitz WW, Quillen D (1977) Acute hormonal response to cigarette smoking. J Clin Pharmacol 17:389-397.
Wise RA (2002) Brain reward circuitry: insights from unsensed incentives. Neuron 36:229-240.
Witkin JM, Tzavara ET, Davis RJ, Li X, Nomikos GG (2005) A therapeutic role for cannabinoid CB1 receptor antagonists in major depressive disorders. Trends Pharmacol Sci 26:609-617.
Wooltorton JR, Pidoplichko VI, Broide RS, Dani JA (2003) Differential desensitization and distribution of nicotinic acetylcholine receptor subtypes in midbrain dopamine areas. J Neurosci 23:3176-3185.
Xi ZX, Spiller K, Pak AC, Gilbert J, Dillon C, Li X, Peng XQ, Gardner EL (2008) Cannabinoid CB1 receptor antagonists attenuate cocaine's rewarding effects: experiments with self-administration and brain-stimulation reward in rats. Neuropsychopharmacology 33:1735-1745.
Xi ZX, Peng XQ, Li X, Song R, Zhang HY, Liu QR, Yang HJ, Bi GH, Li J, Gardner EL (2011) Brain cannabinoid CB receptors modulate cocaine's actions in mice. Nat Neurosci 14:1160-1166.
Yamaguchi T, Sheen W, Morales M (2007) Glutamatergic neurons are present in the rat ventral tegmental area. Eur J Neurosci 25:106-118.
Zimmer A, Zimmer AM, Hohmann AG, Herkenham M, Bonner TI (1999) Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. Proc Natl Acad Sci U S A 96:5780-5785.
Zoli M, Moretti M, Zanardi A, McIntosh JM, Clementi F, Gotti C (2002) Identification of the nicotinic receptor subtypes expressed on dopaminergic terminals in the rat striatum. J Neurosci 22:8785-8789.
Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sorgard M, Di Marzo V, Julius D, Hogestatt ED (1999) Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. Nature 400:452-457.

Résumé

Le système endocannabinoïde (SEC) est composé : de deux neurotransmetteurs principaux qui sont l'anandamide (AEA) et le 2-arachidonoylglycerol (2-AG), de deux enzymes de catabolisme associées, respectivement la Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH) et la Monoacylglycerol Lipase (MAGL); et de deux récepteurs principaux qui sont les récepteurs cannabinoïdes de type 1 (CB1) et de type 2 (CB2). Le SEC exerce un rôle critique dans le contrôle des propriétés récompensantes des substances addictives, dont la nicotine. Cependant, le SEC possède un mode de fonctionnement biphasique et complexe. Par exemple, alors que les propriétés renforçantes et incitatrices de la nicotine sont diminuées par le blocage *aigu* des récepteurs CB1, le comportement de recherche de nicotine peut également être bloqué par l'augmentation *aigüe* du tonus endocannabinoïde (eCB). Par ailleurs, les essais cliniques suggèrent que le traitement *chronique* avec l'antagoniste des récepteurs CB1 produit des effets secondaires liés à l'état émotionnel des fumeurs abstinents. Ces résultats indiquent clairement, que l'utilisation optimale de la pharmacologie cannabinoïde pour le traitement *chronique* du sevrage tabagique reste compliquée et encore mal maitrisée. Le but de ce travail de thèse était d'abord de préciser le rôle des récepteurs CB1 dans le contrôle *aigu* des propriétés addictives de la nicotine, puis de déterminer le rôle de l'AEA dans le contrôle *à long terme* des propriétés incitatives de la nicotine. **L'hypothèse générale** était que la prise volontaire de nicotine, puis le traitement *chronique* avec un inhibiteur de la FAAH, produiraient une augmentation de l'AEA persistante chez le rat abstinent. Celle-ci aurait 2 conséquences : d'une part la réduction du comportement de recherche de nicotine, et d'autre part le développement d'un état anxieux généralisé indépendant de la transmission via les récepteurs CB1. Pour tester cette hypothèse, des rats ont été exposés à l'auto-administration intraveineuse de nicotine pendant 8 semaines puis mis en abstinence pendant 8 semaines. Pendant cette seconde période, les animaux ont été injectés quotidiennement avec un inhibiteur de la FAAH et nous avons caractérisé le comportement de recherche de nicotine et l'état émotionnel de ces rats. Les résultats ont d'abord montré une grande variabilité inter-individuelle dans la prise volontaire de nicotine, nous avons pu identifier des rats à faible consommation (« low consumers ») et des rats à forte consommation (« high consumers »). Il semble que l'inhibition chronique de la FAAH bloque significativement la rechute induite par la drogue et par les stimuli environnementaux chez les « low consumers » abstinents, et reste sans conséquence sur l'état émotionnel des rats. En revanche chez les « high consumers », l'inhibition de la FAAH bloque uniquement la rechute induite par la nicotine et ces animaux restent sensibles aux effets précipitants des stimuli environnementaux. Par ailleurs, ils développent un état anxieux modéré qui n'est pas bloqué par le traitement avec un antagoniste des récepteurs CB1. Ces données suggèrent donc que chez les « high consumers » abstinents, il existe un excès d'AEA qui cible des circuits différents pour moduler les propriétés incitatrices de la nicotine et l'anxiété. En conclusion, cette étude montre que l'inhibiteur de FAAH pourrait être un outil thérapeutique adapté au traitement de l'addiction à la nicotine si l'on prend en compte la variabilité inter-individuelle rencontrée dans la consommation abusive de nicotine.

Discipline : Neurosciences

Mots clé : Nicotine, Auto-administration intraveineuse, Anxiété, Dépression, Récepteur CB1, Anandamide

---

Laboratoire CNRS UMR5287, « Neuropsychopharmacologie de l'addiction »