



**HAL**  
open science

## Contribution à l'étude des addictions: La Cotinine, du tabagisme aux gènes

Victor Omar Riah

► **To cite this version:**

Victor Omar Riah. Contribution à l'étude des addictions: La Cotinine, du tabagisme aux gènes. Biochimie [q-bio.BM]. Faculté des Sciences d'Agadir, 2003. tel-00472018

**HAL Id: tel-00472018**

**<https://theses.hal.science/tel-00472018>**

Submitted on 9 Apr 2010

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

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

**ROYAUME DU MAROC**  
**UNIVERSITÉ IBN ZOHR FACULTÉ DES SCIENCES**

**THÈSE** Présentée par

**Omar RIAH**

*pour obtenir le grade de* **DOCTEUR d'État Es Sciences**

---

**Discipline : SCIENCES DES AGRORESSOURCES**

**Option : NEUROSCIENCES**

---

**CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DES ADDICTIONS : LA COTININE, DU  
TABAGISME AUX GÈNES.**

Soutenue le : 17/05/2003

devant le Jury composé de

Monsieur le Professeur M. A. SERGHINI, Université Ibn Zohr. Agadir	Président
Monsieur le Professeur Ph. COURRIÈRE, Université Paul Sabatier. Toulouse	Rapporteur
Monsieur le Professeur A. AHIDOUCH, Université Ibn Zohr. Agadir	Rapporteur
Monsieur le Professeur J. C. DOUSSET, Université Paul Sabatier. Toulouse	Examineur
Monsieur le Professeur Y. BELAHSEN, Université Ibn Zohr. Agadir	Examineur
Monsieur le Docteur E. ANDRÉ, PIÈRE FABRE SA. Castres	Examineur
Monsieur le Professeur A. G. GUEDIRA, Université Mohamed V. Rabat	Examineur

**Ce travail a été réalisé en collaboration entre Les laboratoires de :**

**Biochimie, Directeur Y. BELAHSEN, FACULTÉ DES SCIENCES  
UNIVERSITÉ IBN ZOHR AGADIR MAROC**

**&**

**Mécanismes d'Action des Nicotianées, Directeur JC DOUSSET, FACULTÉ  
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES UNIVERSITÉ PAUL SABATIER  
TOULOUSE FRANCE**

---

**Il a été subventionné par les contrats :**

**LABORATOIRES PIERRE FABRE MÉDICAMENTS**

**(CONTRACT O. RIAH 1993 – 1994)**

**&**

**INSTITUT DE DÉVELOPPEMENT PIERRE FABRE**

**(CONTRACT O. RIAH 1994 – 1995)**

**&**

**ASSOCIATION DE RECHERCHE SUR LES NICOTINÉES**

**(CONTRACT O. RIAH 1996 - 2000)**

*À la mémoire de*

*Ma mère*

*Mon père*

*Mon beau-père*

*À la mémoire de*

*Professeur P. PAYARD*

*Monsieur P. SCHILTZ*

*À ma femme, pour sa patience et son soutien sans limites,*

*À WAHID, SIHAME et ANIS mes enfants,*

*À mes frères et sœurs,*

*À toute ma famille,*

*À mes amis,*

*À mes collègues de travail,*

*À mes stagiaires*

*À TOUS MES SACRIFICES ET PETITS S, R, L*

*Qu'il me soit permis de remercier chaleureusement tous ceux et celles qui participèrent, de loin ou de près, à cet effort. Et aussi, de souhaiter que cet effort ne soit pas vain et qu'il contribue réellement à faciliter la compréhension du phénomène de l'addiction. Cette connaissance est nécessaire pour mieux prévenir et peut-être apporter une aide médicale aux personnes dépendantes. Mais aussi, elle permet de comprendre les divers mécanismes impliqués dans le développement des comportements tabagiques et toxicomaniaques. L'espoir ultime serait de pouvoir utiliser ces connaissances pour développer des stratégies thérapeutiques nouvelles, la prévention et le traitement des déviations du comportement humain en général.*

Nous tenons à remercier ici tous ceux et celles, avec qui nous avons été heureux d'être en relations à l'occasion de nos recherches : Messieurs et Mesdames, les directeurs, les chercheurs et les techniciens des

*LABORATOIRES ET INSTITUT DE DÉVELOPPEMENT PIERRE FABRE...*

*ASSOCIATION DE RECHERCHE SUR LES NICOTIANÉES (ARN)...*

*SANOFI-SYNTHELABO, Service de Séquençage des Protéines...*

*INSTITUT PASTEUR, Service de Séquençage des Protéines...*

*INSTITUT CLAUDIUS RÉGAUD, Service de Biochimie, Pathologie et Histologie...*

*CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE, Laboratoire de Biologie Moléculaire Eucaryote, Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie Fondamentales*

*ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE, Laboratoire de Biochimie...*

HOPITAL RANGUEIL, *Service de Biochimie* et PURPAN, *Service de Sequençage des Acides Nucléiques...*

UNIVERSITÉ PAUL SABATIER, *Laboratoire de Biologie Cellulaire, ...*

FACULTÉ DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES, *Zoologie et Parasitologie, Synthèse Physico-chimique et Radiobiologique, Oncologie Cellulaire et Moléculaire, Cinétique des Xénobiotiques, Service de Biophysique et de Biomathématiques, Physiologie et Hématologie, Chimie Pharmaceutique, Bactériologie Virologie et Microbiologie Industrielle, Service de Pharmacologie...*

À Monsieur le docteur **M. WEBER**, Michel vous nous avez accueilli dans votre laboratoire et c'est grâce à vous que nous avons fait nos premières preuves en biologie moléculaire. Nous vous remercions pour votre disponibilité et la place que vous nous avez réservée dans votre équipe. Nous avons le plus grand plaisir à vous exprimer nos remerciements.

À Madame le docteur **N. DOUSSET**, vous nous avez fait l'honneur de collaborations fructueuses sur la biochimie de la peroxydation. Nous vous témoignons beaucoup d'amitié et de respect.

À **Monsieur HÉÉ**, ancien chef du Département de Biologie de la SETTA. Nous avons trouvé auprès de vous toute la compréhension, la compétence et la gentillesse, nous vous remercions.

À **Monsieur DUMERY** directeur actuel de l'Association de Recherche sur les Nicotianées et **FEU Monsieur SCHILTZ**, ancien directeur pour avoir retenu notre projet de 1996 à 2000 et pour nous avoir fait bénéficier avec grande amabilité de vos compétences dans le domaine des alcaloïdes du tabac.

À **Messieurs CASSAN, POTHERAT, PRZYBYLSKI** et **LAURE** des Laboratoires et Institut de Développement PIERRE FABRE et l'ensemble du personnel de Toulouse et Castres pour leurs aides inestimables sans lesquelles ce travail n'aurait pas pris une telle dimension.

À **Messieurs ROSENFELD** et **GUILLEMOT** des laboratoires SANOFI-SYNTHÉLABO Toulouse et **DALAYER** de l'INSTITUT PASTEUR, pour avoir bien voulu nous communiquer les séquences.

Nous remercions également Messieurs et Mesdames les Professeurs, Chercheurs et/ou Enseignants, **ÉCALLE, NÉPVEU, OUSTRIN, HOUIN, BAZIARD-MOUYSSET, DUMAS, MICHEL, MALMARY** et **FEU PAYARD, ROQUES, NAVARRO-**



*DELMASSURE, STIGLIANI, LABAT, GARIGUE, BEN BRAHIM, PICAUT,  
HAMISH, MARINA, LE VAN THAI, et RICHARD-FOY Messieurs et Mesdames les  
Techniciens DE NADAÍ, LERMÉ, PECH, FUNTES...*

*Nous remercions vivement le personnel administratif, comptable et des relations avec  
l'économie de l'Université PAUL SABATIER.*

*Merci Monsieur le Professeur AJARA Mbarek, Université Ibn Zohr,  
Faculté des lettres, pour votre travail de traduction, Merci.*

À notre directeur de recherche, Monsieur le **Professeur JC DOUSSET**.

Vous nous avez fait confiance et bénéficié de votre grande compétence. Votre soutien et vos conseils quotidiens nous ont permis de surmonter les moments difficiles. L'expression de notre plus profonde gratitude, vous la trouverez non seulement ici mais en toutes circonstances et en tout lieu, vous qui êtes un ami de toujours. Nous vous remercions aussi d'avoir accepté de juger notre travail.

À notre directeur de recherche, Monsieur le **Professeur Y BELAÏSEN**.

Malgré la distance, vous nous avez soutenu et témoigné un intérêt évident en acceptant de vous associer à notre travail. Nous vous remercions d'avoir accepté de l'améliorer et le juger.

Merci

À Monsieur le **Professeur PH COURRIÈRE**.

qui malgré vos tâches administratives vous nous avez fait part maintes fois de votre expérience des travaux scientifiques. Nous vous devons de précieux conseils, des observations d'une grande portée et nous ne saurions trop vous dire toute notre gratitude pour l'intérêt que vous avez porté à nos recherches. Merci

À Monsieur le **Professeur A. AHDOUCH**.

Nous avons trouvé auprès de vous l'accueil le plus obligeant. C'est peu de dire que grâce à votre compétence, vos conseils et critiques utiles et constructifs nous avons amélioré notre

travail et nos conclusions. Nous vous exprimons toute notre reconnaissance pour avoir accepté de juger notre travail. Merci

À Monsieur, le **Professeur M. A. SERGHINI**.

Nous vous sommes reconnaissant d'avoir trouvé le temps, malgré vos tâches administratives, à consacrer à notre travail. Nous sommes heureux de vous compter parmi les membres de notre jury et vous remercions d'avoir accepté d'améliorer notre travail et le juger. Merci

À Monsieur, le **Professeur A. G. GUEDIRA**.

Malgré la distance et vos tâches administratives, vous avez accepté de participer à notre jury. C'est peu dire que c'est un honneur immense pour nous, car vos compétences et vos expériences des travaux scientifiques vont nous permettre de tirer de précieux conseils et des conclusions d'une grande portée. Nous ne saurions trop vous dire toute notre gratitude pour avoir accepté de juger notre travail. Merci

À Monsieur, le docteur **E. ANDRÉ**.

Nous ne saurons jamais vous décrire l'honneur que vous nous faites d'accepter de juger notre travail. Votre présence à notre jury nous réjouit et permettez-moi de témoigner de notre gratitude aux Laboratoires Pierre Fabre. Votre expertise dans le domaine de la dépendance tabagique et ses approches thérapeutiques actuelles nous ont permis de mieux apprécier nos résultats. Merci.

*Monsieur le président du jury*

*Messieurs les membres du jury*

*Vous me faites le grand honneur d'accepter de  
juger ce travail. Je vous en remercie infiniment et  
vous présente ma respectueuse gratitude.*

## PRÉAMBULE

La cotinine a été identifiée dès les années 1960 comme étant le principal dérivé de la nicotine chez l'homme. Cependant, ses mécanismes d'action ont dérouté bien des chercheurs et son rôle dans l'addiction tabagique n'a pas encore été apprécié. On note surtout peu d'études sur la cotinine et les raisons de ce désintéressement sont difficiles à comprendre, mais ne peuvent pas être attribués à une absence d'activité puisque, au moins, son action hypotensive a été établie dès sa découverte et confirmée par la suite. Certaines raisons ont probablement contribué à ce désintéressement comme la difficulté de l'approche pharmacologique de ses effets : aucun antagoniste n'est connu pour bloquer ses actions. D'un côté, sa structure chimique très voisine de celle de la nicotine n'a pas permis de proposer des mécanismes d'action spécifiques à la cotinine. De l'autre côté, la dépendance à la nicotine est elle-même unique à plusieurs égards. L'interaction de la nicotine avec le récepteur nicotinique à l'acétylcholine (nAChRs) ne s'accompagne pas de la down régulation commune aux autres classes de récepteurs mais d'une up régulation de l'activité de liaison. Il n'y a aucune modification de l'expression des messagers des sous-unités composant le récepteur et par conséquent aucune modification des taux ni aucune internalisation de la protéine réceptrice. Au contraire, pour les autres modèles, l'exposition à l'agoniste produit l'internalisation et la dégradation de la protéine réceptrice. Aussi, dans les aides au sevrage, on utilise de préférence le substitut à

fortes doses et ayant une longue demi-vie, cette approche ne s'applique pas pour la nicotine.... Pour ces raisons, l'étude bibliographique de la présente thèse a été conçue pour être une suite logique et enrichissante de l'étude bibliographique de ma thèse d'université (Riah, 1996) où nous avons largement exposé le problème du tabagisme et de ses approches thérapeutiques, de la nicotine et de ses récepteurs nAChRs. N'ayant pas trouvé satisfaction dans le modèle de l'interaction de la nicotine avec le nAChRs, nous avons présenté, dans cette étude bibliographique et en s'inspirant des autres drogues d'addictions, des modèles nouveaux de l'échelle moléculaires à l'échelle génétique, cellulaire et comportementale pour trouver une uniformité entre toutes les dépendances. Enfin pour proposer notre vue nouvelle et aider la compréhension de nos résultats expérimentaux pour finalement porter un jugement objectif sur le pouvoir d'addiction de l'interaction de la nicotine avec le système cotinine et ses récepteurs de type p40's. Ainsi, les traits de la dépendance tabagisme se comparent forcément aux traits des autres dépendances où les neuromédiateurs classiques (dopamine) ou nouveaux (NO) trouvent leur place.

## RÉSUMÉ

L'usage du tabac, de l'alcool, des opiacées et ou d'autres psychostimulants est une addiction. Les mécanismes responsables de l'initiation et du maintien de l'addiction sont également impliqués dans les déviations du comportement en général. Les mécanismes à la base des prédispositions, le début et les raisons de l'évolution vers un état dépendant et les raisons des rechutes font l'objet d'intenses investigations. Les effets toxiques de la nicotine et les dérégulations homéostatiques qu'elle entraîne dépendent de la dose, du mode d'administration, de la chronicité, du génome considéré et des interactions avec son principal dérivé la cotinine, obtenu par l'addition d'un atome d'oxygène en position  $\alpha$  du noyau pyrrolidine. Les conséquences de ce métabolisme ont été évaluées, dans l'étude présente, en partant des structures chimiques de ces deux alcaloïdes jusqu'à l'isolement des mécanismes biochimiques, neurochimiques, moléculaires et comportementaux de leurs actions. Nos travaux permettent de proposer de nouveaux concepts dans l'espoir de différencier les susceptibilités et de développer de nouvelles approches préventives et thérapeutiques.

### **Mots Clés.**

Cancer, Tabagisme, Addictions, Xénobiotiques, Nicotine, Cotinine.

Organisme, Organe, Cellules, Récepteurs, Expression, Clone.

Pharmacocinétique, Pharmacodynamique, Actions, Interactions, Résistance.

Stress, Contexte, Récompense, Aversion, Psychomoteur, Douleur, Perception.

Neurotransmetteurs, Vasodilatation, Peroxydes, NO, O<sub>2</sub>.

Intégration, Cellule, Molécule, Gène, Évolution, Sensibilisation, Désensibilisation,

Homéostasie, Hédonisme, Psychosociale, Psychiatrie, Adaptation, Neurobiologie, Santé,

Systèmes d'Aides.

**CETTE THÈSE SE COMPOSE DE DEUX VOLUMES :**

**LE VOLUME I CONSACRÉ À L'ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

**ET**

**LE VOLUME II CONSACRÉ AUX RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX**



**Volume 1 : Etude bibliographique**

**ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

# Volume 1 : Etude bibliographique

## SOMMAIRE

ملخص

---

### RÉSUMÉ

---

### ABSTRACT

---

### INTRODUCTION GÉNÉRALE

---

### ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

---

A- LES XÉNOBIOTIQUES ET LEURS EFFETS

---

A-I- INTERACTION XENOBIOTIQUE ET MOLECULES BIOLOGIQUES

---

A- I- 1- LIAISONS FAIBLES

---

A- I- 2- LIAISONS FORTES

---

A- II- XENOBIOTIQUES ET FONCTIONNEMENT DE LA CELLULE

---

A- II- 1- INTERACTION XENOBIOTIQUE ET MEMBRANE CELLULIARE

---

A- II- 2- XENOBIOTIQUES ET ACTIVITE MITHOCHONDRIALE

---

A- II- 3- XENOBIOTIQUES ET FONCTIONS LYSOSOMIALES

---

A- III- ETUDE TOXICOLOGIQUE D'UNE NOUVELLE MOLECULE

---

A- IV- LE FOIE ORGANE CIBLE POUR LES TOXIQUES

---

A- V- FACTEURS INFLUENCANTS L'HEPATOTOXICITE

---

### INDUITE PAR LES XENOBIOTIQUES

---

A- VI- DETOXIFICATION DES XENOBIOTIQUES

---

A- VII- PHASES DU TRANSIT D'UN XENOBIOTIQUE

---

### DANS L'ORGANISME

---

A- VIII- ROLE DU FOIE DANS LA BIOTRANSFORMATION

---

### DES XENOBIOTIQUES

---

A- IX- MODELES EXPERIMENTAUX

---

A- X- L'IN VIVO ET L'IN VITRO

---

A- XI- L'IN VITRO ET L'ETHIQUE

---

A- XII- LES LESIONS TOXIQUES ET MORT CELLULAIRE

---

A- XII- 1- HISTORIQUE

---

A- XII- 2- APOPTOSE /NECROSE

---

A- XII- 3- NECROSE

---

A- XII- 4- APOPTOSE

---

A- XII- 4- 1- Aspects morphologiques

---

A- XII- 4- 2- Aspects biochimiques

---

A- XII- 4- 3- Perturbations biochimiques et toxicité

---

A- XII- 4- 3- 1- Calcium et cytotoxicité

---

A- XII- 4- 3- 2- Glutathion et toxicité

---

A- XII- 4- 3- 3- Déplétion en ATP et toxicité

---

A- XII- 4- 4- Contrôle génétique de l'apoptose

---

A- XII- 4- 5- L'apoptose pathologique et expérimentale

---

B- BASES CELLULAIRES ET MOLÉCULAIRES DES ADDICTIONS

---

B- I- UP-RÉGULATION DE LA VOIE DE L'AMPc

---

B- II- ADAPTATIONS DANS LE COUPLAGE

---

### RÉCEPTEUR-PROTÉINES G

---

B- III- ADAPTATIONS CELLULAIRES ET MOLÉCULAIRES

---

### DE LONGUE DURÉE

---

B- IV- POUR LE FUTUR

---

C- BASES GÉNÉTIQUES DES ADDICTIONS

---

C- I- EXISTENCE ET INTERVALLE D'INFLUENCE DE LA GÉNÉTIQUE

---

C- II- DE LA THÉORIE AUX GÈNES D'ACTUALITÉ

---

## Volume 1 : Etude bibliographique

C- II- 1-	CARTOGRAPHIE DES "QTL"
C- II- 2-	MANIPULATION MOLÉCULAIRE DES GÈNES CANDIDATS
C- II- 3-	ÉTUDES AVEC LES ANTISENS ou ODN
C- II- 4-	ÉTUDE AVEC LES LIGNÉES KNOCK-OUT ET TRANSGÉNIQUES
C- II- 4- 1-	Gène du récepteur 1B de la sérotonine
C- II- 4- 2-	Gènes des récepteurs de l'acide $\gamma$ -amino butyrique ou GABA
C- II- 4- 3-	Gènes affectant la fonction dopaminergique
C- II- 4- 4-	Neurotoxicité des monoamines
C- II- 4- 5-	Gènes affectant le système opiacé
C- II- 4- 6-	Manipulations d'autres gènes
C- II- 4- 7-	Interprétation des résultats de manipulation de gènes
C- II- 5-	AUTRES APPROCHES GÉNÉTIQUES NOUVELLES
C- III-	CONCLUSIONS
D-	LA DÉPENDANCE DANS LA PERSPECTIVE ÉVOLUTIVE
E-	ET AIDES MÉDICALES
D- I-	LES DROGUES QUI STIMULENT LES ÉMOTIONS POSITIVES
D- II-	LES DROGUES QUI BLOQUENT LES ÉMOTIONS NÉGATIVES
D- III-	CONCLUSIONS
D- IV-	APPROCHES THÉRAPEUTIQUES
D- V-	LES DIFFÉRENTS TRAITEMENTS
D- V- 1-	LA DÉTOXICATION
D- V- 2-	LES MÉDICAMENTS AGONISTES
D- V- 3-	LES MÉDICAMENTS ANTAGONISTES
D- V- 4-	LES COMBINAISONS AGONISTES ET ANTAGONISTES
D- V- 5-	LES MÉDICAMENTS ANTI-BESOIN
D- V- 6-	BLOCAGE DU MÉTABOLISME DE L'ALCOOL
D- V- 7-	LA VACCINATION
D- VI-	CONCLUSION : LE SYSTÈME MÉDICAL AUX ÉTATS UNIS
E-	ET LES ADDICTIONS
E-	RÔLES DU MONOXYDE D'AZOTE DANS LES ADDICTIONS
E- I-	GÉNÉRALITÉS SUR LE MONOXYDE D'AZOTE
E- II-	LIBÉRATION DES NEUROTRANSMETTEURS ET LE NO
E- III-	PARTICIPATION DU PEROXYNITRITE (OONO-)
E-	ET SES INTERACTIONS AVEC LE NO
E- IV-	LA DÉPENDANCE AUX OPIOIDES ET LE NO
E- V-	LA DÉPENDANCE À L'ALCOOL ET LE NO
E- VI-	LA DÉPENDANCE AUX PSYCHOSTIMULANTS ET LE NO
E- VII-	LA DÉPENDANCE À LA NICOTINE ET LE NO
E- VIII-	CONCLUSIONS
	<b>RÉFÉRENCES</b>

# Volume 1 : Etude bibliographique

## FIGURES

Figure 1. Mécanismes de la péroxydation lipidique

---

Figure 2. Séquence des modifications ultrastructurales conduisant  
à la nécrose et à l'apoptose

---

Figure 3. Schéma illustrant le cycle de vie de l'addiction : effet complexe  
et temps dépendant de l'exposition à une drogue

---

Figure 4. Schéma illustrant l'action des opioïdes dans le locus coeruleus

---

Figure 5. Schéma illustrant les mécanismes possibles de modifications induites  
par les drogues sur la sensibilité des récepteurs opioïdes ou dopamine-D2

---

Figure 6. Biosynthèse du NO

---

Figure 7. Présentation schématique de la libération des neurotransmetteurs  
induite par le NO et le OONO-

---

Figure 8. Devenir du NO et du OONO-

---

Figure 9. Modèle de fonctionnement de la voie du NO dans le SNC

---

## TABLEAUX

Tableau I. Sélectivité de quelques inhibiteurs de NOS

---

Tableau II. Stimulation des neurotransmetteurs par des donneurs de NOS

---

Tableau III. Libération de l'acétylcholine par le NO

---

Tableau IV. Libération de la dopamine par le NO

---

Tableau V. Libération de la Noradrénaline par le NO

---

Tableau VI. Libération d'acides aminés neuro-actifs par le NO

---

Tableau VII. Les agents du système NO et le syndrome de retrait des principales  
drogues d'addiction

---

## ملخص

يعتبر التدخين إدماناً مماثلاً لأنواع الإدمان الأخرى، كالكحول والأفيون والنشطات المخدرة. ذلك أن الإصابات المسؤولة عن بداية حالة الخضوع و عن إبقائها هي السبب أيضاً في الانحرافات السلوكية بصفة عامة، كالانحرافات الغذائية و العودة المكروهة إلى المخدرات بعد الإقلاع عنها... فمادة النيكوتين لورقة التبغ سامة للغاية، إذ تصل- عند امتصاصها- إلى الدماغ و إلى الجسم بأكمله، و تنشط كل الأعضاء التي تستقبلها، و تحدث تأثيرات سامة و تكيفات ذاتية. و تتراوح هذه التأثيرات بحسب كمية التدخين و كفاءته و مدته و درجة مفعوله و نوعيته، و بحسب تفاعله مع مشتقه الأساس الذي هو الكوتينين (Cotinine)، و هو مادة تنتج عن إضافة ذرة واحدة من الأوكسجين في و ضعية ألفا ( $\alpha$ ) إلى نواة البيروليدين (Pyrolidine).

لقد تم ، في هذه الأطروحة، تقويم عواقب هذه التقلبات انطلاقاً من البنات الكيماوية لهذين القلويدين (alcaloïdes) ووصولاً إلى فرز وإليات اشتغالهما البيوكيماوية (biochimiques) و الكيماوية العصبية (neurochimiques) و الجزيئية (moléculaires) و السلوكية. و قد تم التحقق من هذه الإليات المختلفة، بفضل دراسة متكاملة أعتبرت الأوكسيد الأحادي أزوت نو (Azote NO) بمثابة السبب في الإدمان على التدخين، مما يتطابق مع معطيات البحث البيبليوغراف التي تشرك هذا السبب في كل أنواع الإدمان. فالإليات التي تقوم على أسسها القابلية و بداية التطور إلى حالة الإدمان و أسبابه، بالإضافة إلى أسباب العودة إلى التدخين، كانت محط بحوث مكثفة، ذلك أن الدراسات في هذا المجال تشير إلى أن بعض التغييرات التي تمس البروتينات ترسل إشارة طويلة الأمد إلى الأصناف التفاعلية للأوكسجين و النيتروجين هي المتسببة في إليات المضاعفات و الإنهيارات على المدى الطويل. وهكذا يخلص بحثنا إلى النتائج التالية :

إنعدام التسمم في الكوتينين

حركية تنشيطية نفسية صرفة

علم جديد للصيدلة لا يرتكز على النيكوتين

ممر حيوي في الدماغ بواسطة نظام نيكوتيني خارجي

الشكل الداخلي و الخارجي لنمو الكوتينين

وساطة الحركة المضادة لإرهاف المستقبل للكوتينين (P40) و المتجانس مع البروتينات البشرية المسببة لردود الأفعال

الإلتهاابية و هي وساطة مثيرة لنمو النواة.

دور في تحرير الدوبامين (Dopamine)

التسبب في إرهاف مؤكسد بواسطة جرعة الكوتينين

مضاعفة لسياق المقاربات المرنة

المساهمة الكبيرة للحالات الانفعالية و للقلق في تناول مادة الكوتينين أو الإمساك عنها

إن كل هذه النتائج تسمح بإفترض أن النيكوتين بشتغل بطريقة مباشرة و غير مباشرة من خلال تحوله إلى كوتينين. و تعمل مادة الكوتينين هذه عبر مستقبلها على المستوى المركزي للدماغ بواسطة ال(P40)، و ذلك لتعديل مستوى الدوبامين، مع ما يترتب عنه من عواقب على التناول و التعويض و الإرهاق المؤكسد و الالهفة و الاستجابات الجامعة و المحبطة على المدى الطويل.

و الخلاصة هي أن نتائجنا تمكن من اقتراح أهداف جديدة لعلم الصيدلة، ومناهج و تصورات تسمح بفهم الإدمان على التبغ على المستوى البيوكيماوي و الكيماوي العصبي و الجزئي و السلوكي. و نأمل أن توظف هذه المعلومات في تغيير وجهة النظر إلى قابلية الإدمان، و في تطوير مقاربات جديدة وقائية و علاجية.

## RÉSUMÉ

Le tabagisme est reconnu comme une dépendance comparable aux autres dépendances : alcool, opiacées et autres psycho-stimulants. Les mécanismes responsables de l'initiation et du maintien de l'addiction sont également impliqués dans les déviations comportementales en général, comme les déviations nutritionnelles, les compulsions.... La nicotine de la feuille de tabac est très toxique, dès son absorption, elle atteint le cerveau et tout l'organisme, active ses récepteurs et produit des effets toxiques et des adaptations homéostatiques. L'importance de ses effets va dépendre de la dose, du mode d'administration, de la chronicité, de l'effet considéré, du génome considéré et des interactions avec son principal dérivé, la cotinine. La cotinine résulte de l'addition d'un atome d'oxygène en position  $\alpha$  du noyau pyrrolidine. Les conséquences de cette métabolisation ont été évaluées, dans l'étude présente, en partant des structures chimiques de ces deux alcaloïdes jusqu'à l'isolement des mécanismes biochimiques, neurochimiques, moléculaires et comportementaux de leurs actions. Ces différents mécanismes ont été validés par une étude intégrative en pointant le monoxyde d'azote NO comme un médiateur de la dépendance tabagique, en accord avec les données de l'étude bibliographique qui impliquent ce même médiateur dans toutes les dépendances. Les mécanismes à la base des prédispositions, le début et les raisons de l'évolution vers un état dépendant et les raisons des rechutes font l'objet d'intenses investigations. Les travaux dans ce domaine suggèrent que certaines modifications des protéines transmettent un signal de longue durée et que les espèces réactives de l'oxygène et du nitrogène sont à la base des mécanismes de potentialisation et de dépression à long terme. Notre travail montre une absence de toxicité pour la cotinine [422,423], une activité psychostimulante pure [414], une pharmacologie nouvelle non nicotinique [416,417,419,422,423], un passage actif [415] dans le cerveau régulé par le système nicotinique périphérique [412,421], la forme endogène et

exogène de la cotinine [424], la médiation d'activité anti stress du récepteur p40 de la cotinine [420] et son homologie avec les protéines humaines impliquées dans les réactions inflammatoires [36,161], stimulatrice paracrine de la croissance cellulaire [55], un rôle dans la libération de dopamine, la production d'un stress oxydant par l'administration de la cotinine [418], un renforcement dans le contexte des approches flexibles, la participation forte des états émotionnels et d'anxiété à l'action anxiolytique de l'administration et anxiogène du retrait de la cotinine. Ils permettent de proposer que la nicotine agit directement et indirectement par sa conversion en cotinine. Cette dernière agit par ses récepteurs, au niveau central par la p40, pour moduler les taux de dopamine avec des conséquences sur l'apprentissage, la récompense, le stress oxydatif, l'anxiété et les réponses potentialisées et déprimées à long terme.

Comme conclusion, nos travaux permettent de proposer de nouvelles cibles pharmacologiques, méthodes et concepts permettant de comprendre à l'échelle biochimique, neurochimique, moléculaire et comportemental l'addiction tabagique. L'espoir est d'utiliser ces connaissances pour différencier les susceptibilités et développer de nouvelles approches préventives et thérapeutiques.



## ABSTRACT

Tobacco smoke is recognized as an addiction that is comparable to all other addictions : alcohol, opioide and psychoactive drugs addictions. The mechanisms responsible for the initiation and maintain of addictions are also implicated in other forms of human behavior deviations, like feeding deviations, compulsion .... Nicotine from tobacco leaf is very toxic, once absorbed, it reaches the brain and anywhere in the body, activates its receptors and produce toxic effects and homeostatic adaptations. The importance of its effects will depend on dose, mode of administration, chronicity, the effect being considered, the genome considered and its interactions with its main derivative, cotinine. Cotinine results from the addition of an oxygen atom to the  $\alpha$  position of the pyrrolidine ring. The consequences of this conversion has been evaluated, in the present study, starting from the chemical structure of these alkaloids to the isolation of biochemical, neurochemical, molecular and behavioral mechanisms of their actions. These distinct mechanisms were validated through an integrative study, pointing on possible contribution of nitric oxide as a modulator of tobacco smoke dependence, in agreement with results of the literature study implying this neuromediator in all forms of dependence. The mechanism sustaining predisposition, the initiation and the reasons for the evolution toward dependence and relapses are currently investigated. The works in these fields suggest that modifications of certain proteins propagate long term signals and that reactive oxygen and nitrogen species are behind the mechanisms of long term potentiation and depression. Our work shows that cotinine is not toxic [422,423], is a pure psychoactive drug [414], with a novel non nicotinic pharmacological profile [416,417,419,422,423], is transported into brain [415], and its transport is regulated through peripheral nicotinic acetylcholine receptors [412,421], shows the endogenous and exogenous forms of cotinine [424], the cotinine receptor mediation of

anti stress activity [420] and its homology to human proteins implicated in inflammatory reactions [36,161], paracrine stimulation of cell growth [55], dopamine release and the production of lipid peroxydation by cotinine administration [418], reinforcement in flexible approaches, the participation of emotional states and anxiety to anxiolytic response of the administration and anxiogenic response of withdrawal. They permit to propose that nicotine acts directly and indirectly through its conversion to cotinine. The later acts principally through its receptors, in brain through p40, to modulate dopamine release with consequence on learning, reward, oxidative stress, anxiety and long term potentiation and depression responses.

As a conclusion, our work has permitted to propose novel pharmacological targets, methods and concepts in attempt to unify biochemical, neurochemical, molecular and behavioral mechanisms of addiction, hoping that these knowledge will be used to understand differences in susceptibility and to develop novel approaches for prevention and treatment.

# **INTRODUCTION GÉNÉRALE**

---

## **INTRODUCTION GÉNÉRALE**

## INTRODUCTION GÉNÉRALE

---

Notre démarche s'inscrit dans le cadre de l'évaluation des pouvoirs d'addiction des drogues notamment de la nicotine et de son dérivé la cotinine. Par l'étude des mécanismes cellulaires, moléculaires, génétiques et comportementaux capables d'informer sur l'initiation et le maintien de la dépendance, on peut apprécier les raisons des déviations du comportement humain et de la mise sur le marché de nouveaux médicaments. Nous sommes donc intéressés de plus près à la cotinine dont les effets et les mécanismes d'action sont peu connus. Nous avons utilisé les démarches et les outils modernes pour évaluer, mesurer et caractériser son mode d'action et suggérer les mécanismes potentiellement impliqués. Ces outils de la recherche actuelle nous ont permis, dans un premier temps, de caractériser les propriétés toxicologiques, pharmacologiques et pharmacocinétiques de la cotinine et de développer, dans un deuxième temps, des outils et des méthodes spécifiques à l'étude chez l'animal des mécanismes de la dépendance à la cotinine. En particulier, nous avons évalué la tolérance c'est-à-dire l'augmentation de la dose, la sensibilisation ou réversion de tolérance et le syndrome de retrait lorsque la cotinine n'est plus disponible. Chez l'homme, ce syndrome est désagréable et il est responsable des rechutes et des conséquences de l'addiction sur le bien-être physique et moral. Ces effets se traduisent aussi par des dérégulations de l'homéostasie et des adaptations dont l'importance, va dépendre de la dose, du mode d'administration, de la chronicité, de l'effet considéré et d'un génome particulier. Les bases de la sensibilité à la cotinine ont été évaluées chez l'animal de laboratoire. Les résultats sont en accord avec les travaux réalisés chez l'homme. Afin d'apporter un maximum d'information pour faciliter la compréhension du phénomène complexe de l'addiction, et précisément pour montrer que nos connaissances actuelles dans ce domaine sont encore limitées, nous avons exposé de manière progressive la complexité du problème.

## INTRODUCTION GÉNÉRALE

---

**Le premier chapitre de l'étude bibliographique** est consacré aux actions des xénobiotiques ou substances exogènes, qui ne sont utilisées ni pour produire de l'énergie ni pour la synthèse des molécules biologiques, et leurs conséquences toxicologiques et adaptatives. **Dans le deuxième chapitre**, l'interaction de certaines substances aura en plus comme conséquence une initiation et un maintien de la consommation ce qui caractérisent un état de dépendance. Ces drogues particulières sont douées d'un pouvoir d'addiction parce qu'elles sont capables d'interagir avec les neurones et les neurotransmetteurs utilisés par nos systèmes d'appréciation du plaisir. **Dans le troisième chapitre**, j'ai exposé les apports de l'approche génétique pour identifier les gènes impliqués dans les susceptibilités individuelles et l'importance de tel ou tel locus par rapport au pouvoir d'addiction. Malgré la diversité des classes de drogues étudiées, les loci identifiés et les interactions moléculaires initiales, les addictions présentent des caractéristiques en commun surtout à l'échelle comportementale. Par conséquent, la validation de l'hypothèse d'un même mécanisme initial à la base de la dépendance aux différentes classes de drogues est en cours. **Dans le quatrième chapitre**, j'ai exposé les approches thérapeutiques basées sur la modulation des émotions et les médications disponibles pour le traitement des addictions. **Dans le cinquième chapitre**, j'ai exposé les rôles du monoxyde d'azote (NO) dans la relaxation de l'artère, la libération des neurotransmetteurs, la neurotransmission, la mort cellulaire programmée, la potentialisation et la dépression à long terme de l'activité synaptique, la maturation et l'efficacité de la synapse qui font du NO le messenger par excellence commun à toutes les addictions unifiant ainsi les différentes théories.

Le concept de base étant de faire appel aux différentes approches expérimentales des différentes addictions pour situer notre travail et confronter nos résultats particuliers et les résultats obtenus avec d'autres classes de drogues afin de ressortir une certaine uniformité malgré les différentes classes de drogue d'addiction. Un paragraphe décrivant le matériel et

## INTRODUCTION GÉNÉRALE

---

méthodes est inclus dans les différentes parties des travaux personnels, facilitant l'accès à l'information recherchée. Les références des techniques utilisées sont incluses et nous avons détaillé surtout ce que nous avons fait de spécifique.

Les travaux personnels ont également été structurés et présentés de manière à s'inscrire dans une démarche scientifique et à faire émerger les conclusions tirées.

**Dans le premier chapitre**, nous avons présenté les synthèses chimiques qui vont nous servir pour mener à bien notre projet. En particulier, nous avons synthétisé la cotinine pour une utilisation intensive et parce que la cotinine commerciale est rapportée de moindre pureté et son prix est inabordable. Nous avons également synthétisé la N-oxyde de cotinine, le dérivé principal de la cotinine, pour évaluer sa contribution potentielle aux effets de la cotinine, en particulier les interactions synergiques. Nous avons également inclus la nornicotine et deux espèces de mouches pour valider largement **le concept de la synergie** [422], **à la base de l'hypothèse d'effets de la cotinine et l'existence de ses récepteurs**. Nous avons également synthétisé la N,n-propyl-carboxamide cotinine, un équivalent du bras espacer du gel d'affinité, pour évaluer la possibilité qu'un tel gel est utilisable pour isoler les récepteurs de la cotinine [419]. Nous avons terminé cette première partie en confirmant **chez les mammifères l'interaction synergique et sa nature non nicotinique** [423]. **Dans le second chapitre**, nous avons évalué l'influence des facteurs pharmacocinétiques [415] et pharmacodynamiques [421] sur le passage de la cotinine dans le cerveau. **Ces résultats confortent l'action centrale de la cotinine et suggèrent que la synergie passe par un récepteur de la cotinine qui reste à identifier plutôt qu'une coopérativité spatiale**. **Dans le troisième chapitre**, nous avons identifié les récepteurs de la cotinine. Ce récepteur est également sensible à l'administration chronique de la cotinine et serait bloqué par la nicotine, permettant de proposer sa médiation de **l'activité anti-stress de la nicotine** [420]. **Dans le quatrième chapitre**, l'effet de la cotinine sur la **libération de la noradrénaline et de la dopamine** a été

## INTRODUCTION GÉNÉRALE

---

évalué *in vitro* dans cinq régions cérébrales. En particulier, la libération de dopamine dans le striatum permet de proposer une explication rationnelle à l'effet thérapeutique de la mécamylamine [430-432]. De plus, le rôle de la dopamine dans **l'hyperactivité** et le **stress oxydant** est très important dans les addictions. **Dans le cinquième chapitre**, nous avons développé le modèle d'**administration de la nicotine et de la cotinine dans l'eau de boisson** et analysé la consommation de manière comportementale et ses conséquences sur la **perception de la douleur, la prise de poids, l'activité openfield, la peroxydation lipidique et la modulation de quatre récepteurs dont deux nouveaux ont été clonés**. Les effets de la cotinine ont montré le caractère potentialisation et dépression à long terme (**LTP** et **LTD**). Nous avons donc terminé par l'évaluation *in vitro* de la participation du facteur de relaxation dépendant de l'endothélium (**EDRF**), identifié dans les années 1990 comme étant le monoxyde d'azote (**NO**), à l'activité de relaxation de la cotinine et isolé la **p40 de l'aorte** avant de **DIRE NO À LA COTININE**. Nous terminerons par une discussion générale et une conclusion.

# **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

**A- LES XÉNOBIOTIQUES ET LEURS EFFETS**

**B- BASES MOLÉCULAIRES ET CELLULAIRES DES ADDICTIONS**

**C- BASES GÉNÉTIQUES DES ADDICTIONS**

**D- LA DÉPENDANCE DANS LA PERSPECTIVE ÉVOLUTIVE ET AIDES  
MÉDICALES**

**E- RÔLE DU MONOXYDE D'AZOTE (NO) DANS LES ADDICTIONS**



# **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

## **A- LES XÉNOBIOTIQUES ET LEURS EFFETS**

Sous le terme général de xénobiotique, on désigne les substances étrangères à l'organisme et qui ne sont jamais utilisées par les cellules pour produire de l'énergie ou synthétiser des molécules biologiques. Ces substances sont naturelles ou synthétiques.

### **A-I- INTERACTION XENOBOTIQUE ET MOLECULES BIOLOGIQUES**

Les effets pharmacologiques ou toxiques observés après l'administration d'un produit chimique à un organisme découlent toujours de l'interaction initiale entre molécules : le produit et/ou un ou plusieurs de ses métabolites, et une ou plusieurs molécules biologiques constitutives de l'organisme. C'est cette interaction chimique qui va provoquer l'ensemble des réponses biologiques, aussi complexes qu'elles puissent être. La plupart des molécules biologiques sont des espèces chimiques stables. Néanmoins, l'environnement biochimique dans les organismes vivants est favorable à l'établissement d'interactions variées, faibles et réversibles ou fortes et irréversibles, avec formation ou rupture de liaisons covalentes. Les différences de polarité et la présence de groupement ionisés sont favorables aux interactions faibles que sont les liaisons hydrophobes, les liaisons ioniques et les liaisons hydrogènes. Les groupements nucléophiles, portés par diverses molécules dont les protéines et les acides nucléiques, peuvent réagir spontanément avec les groupements électrophiles des xénobiotiques, donnant naissance à des liaisons covalentes fortes. Ceci d'autant plus facilement que les nombreux métaux (fer, cuivre, ...) présents dans les molécules biologiques sous divers états d'oxydation, jouent le rôle de catalyseur transformant les xénobiotiques en espèces électrophiles souvent instables et hautement réactives. La présence d'une concentration élevées d'oxygène dans les milieux biologiques va favoriser, dans certains cas, la

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

formation d'espèces activées de l'oxygène initiant des réactions radicalaires principalement avec les constituants lipidiques cellulaires, mais également avec les protéines et les acides nucléiques [444].

### **A- I- 1- LIAISONS FAIBLES**

Les liaisons faibles hydrogène et les interactions hydrophobes et de Van der Waals sont à la base de l'organisation de nombreuses structures biologiques. Par exemple, les membranes cellulaires sont constituées de lipides qui s'associent en bicouches sous l'influence d'interactions hydrophobes, et les liaisons entre la plupart des messagers biologiques (hormones, facteurs de croissances, ...) et leurs récepteurs protéiques s'effectuent par des interactions de Van der Waals et des liaisons ioniques. Certains xénobiotiques vont s'intégrer dans les bi-couches lipidiques membranaires par interaction hydrophobe, altérant leurs propriétés. L'éthanol, les anesthésiques et de nombreux solvants organiques provoquent ainsi une diminution de la fluidité membranaire. L'insertion des ionophores va provoquer des trous dans la continuité membranaire et permettre à certains ions de pénétrer dans le cytoplasme. L'interaction faible est également à l'origine de l'inhibition de nombreuses enzymes, par exemple, les inhibitions de la catalase par l'aminotriazole, ou des estérases par les organophosphorés. Ces interactions sont régies par la constante d'affinité du produit pour le site récepteur ou le site enzymatique et sont le plus souvent réversibles, à moins que l'effet biologique ait entraîné rapidement la mort de l'organisme. Ainsi, la durée de l'action toxique des carbamates et des organophosphorés est proportionnelle à leur affinité pour le site de l'acétylcholinestérase qu'ils inhibent. Leurs effets peuvent être annulés par l'action d'un antidote les déplaçant. Cependant, il serait simpliste de penser que la démonstration, *in vitro*, de l'interaction d'un produit avec un récepteur ou avec une enzyme, purifié et isolé de leur environnement, suffise à prédire l'action du produit *in vivo* et la cible tissulaire de l'action pharmacologique ou toxique.

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

### **A- I- 2- LIAISONS FORTES**

Les xénobiotiques peuvent entrer dans diverses réactions chimiques avec les molécules biologiques. Les plus fréquentes sont les alkylations des protéines ou des acides nucléiques, et les oxydations des protéines, des acides nucléiques ou des lipides. Ces réactions chimiques entraînent la rupture ou la formation de liaisons covalentes et stables, ces altérations étant spontanément irréversibles. Certains produits chimiques sont suffisamment électrophiles pour attaquer spontanément les nombreux sites nucléophiles présents dans les molécules biologiques. La plupart des produits chimiques sont stables et ont besoin d'être activés pour pouvoir réagir avec les molécules biologiques. Cette activation est rendue possible par la présence, dans les organismes vivants, de nombreux métaux qui jouent le rôle de catalyseurs et qui abaissent le seuil d'énergie nécessaire pour la réalisation des réactions. Les cytochromes P450 sont dotés d'un atome de fer qui peut osciller entre divers états d'oxydation. D'autres enzymes contiennent un atome de cuivre. Au sein de l'organisme, certains xénobiotiques peuvent s'auto-oxyder comme l'ozone, l'oxyde d'azote, les métaux de transition [102,202]. D'autres molécules peuvent être métabolisées en espèces radicalaires comme les alkènes polyhalogénés [467]. Ces radicaux libres, hautement réactifs, peuvent directement, ou par réduction de l'oxygène, soit attaquer les acides gras insaturés et initier une réaction de peroxydation lipidique, soit oxyder les protéines ou les molécules d'ADN. Les interactions fortes modifient les molécules biologiques de façon irréversible. Néanmoins, il existe dans les cellules un ensemble de mécanismes pour prévenir ces interactions. Les réactions, dites de phase II, du métabolisme des xénobiotiques aboutissent, dans la plupart des cas, à la formation de composés atoxiques, rapidement excrétés, ce qui empêche les composés réactifs d'exercer leur action toxique. Ce sont les réactions de glucuronoconjugaison, de sulfatation, d'acetylation, d'hydrolyse des époxydes, et de glutathion-conjugaison qui sont catalysées par des enzymes

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

spécifiques microsomiales ou cytosoliques. Ces enzymes sont, dans leur grande majorité, localisées dans les hépatocytes et agissent de concert avec les cytochromes P450 et autres enzymes de phase I. Ceci explique qu'un produit peut-être déclaré toxique *in vitro* sur des cellules ne le métabolisant pas alors qu'il sera moins toxique *in vivo*, étant métabolisé lors de son passage dans le foie. La prévention des réactions radicalaires est assurée par de nombreux systèmes. Les enzymes, telle la superoxyde-dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase, désactivent certaines espèces réduites de l'oxygène. Les antioxydants cellulaires, vitamine E et beta-carotène, piègent les radicaux libres oxygénés. Ces enzymes et ces antioxydants ainsi que certains scavengers radicalaires comme le mannitol ou le dimethylsulfoxyde (DMSO) sont souvent utilisés pour imputer la toxicité d'un produit à un mécanisme radicalaire. Cette approche est critiquable lorsqu'elle est appliquée à des systèmes cellulaires. Ainsi, si la déplétion cellulaire en glutathion peut-être considérée comme un marqueur de toxicité radicalaire, il ne faut cependant pas oublier que le stock en glutathion peut également être épuisé par la voie des glutathion transférases et refléter sa conjugaison à un métabolite du produit.

### **A- II- XENOBIOTIQUES ET FONCTIONNEMENT DE LA CELLULE**

#### **A- II- 1- INTERACTION XENOBIOTIQUE ET MEMBRANE CELLULAIRE**

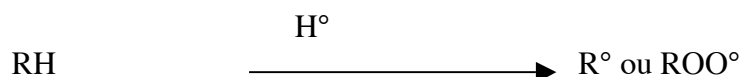
L'organisation en bicouche lipidique dans laquelle s'insèrent des protéines spécialisées, les récepteurs, les pompes ou canaux, confère à la membrane ses propriétés spécifiques. En particulier la perméabilité sélective de la membrane permet à la cellule de maintenir un milieu interne constant et des gradients de concentration ioniques parfois énormes. La concentration en Ca<sup>2+</sup> cytosolique est par exemple environ 10 000 fois plus faible que la concentration en Ca<sup>2+</sup> extracellulaire. Le

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

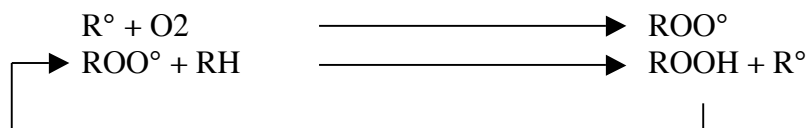
flux entrant de  $\text{Ca}^{2+}$ , qui est passif via divers canaux spécifiques, est compensé par une extrusion active grâce à des ATPase calciques ou des échangeurs sodium-calcium. La composition, l'organisation structurale et les propriétés de la membrane interviennent dans l'entrée plus ou moins facile des xénobiotiques à l'intérieur de la cellule. Les molécules polaires ne peuvent pas franchir la bicouche lipidique et doivent emprunter les canaux, tandis que les molécules lipophiles peuvent la traverser sans encombre. Certaines substances hydrophobes comme les anesthésiques s'accumulent dans les lipides membranaires et en modifient ainsi la fluidité. D'autres xénobiotiques, comme les esters apolaires pénètrent facilement dans le cytoplasme où ils sont hydrolysés en molécules polaires incapables de ressortir. Parmi les interactions moléculaires qui induisent des processus de toxicité aiguë, la peroxydation des lipides membranaires est sans doute l'une des plus importante (Fig. 1). Celle-ci est générée par des molécules natives très réactives (tétrachlorure de carbone, ozone, oxyde d'azote, métaux de transition, ...) [102, 202] ou par des métabolites de xénobiotiques capables d'initier des réactions d'auto-oxydation au niveau des membranes. Par exemple les alkènes polyhalogénés sont métabolisés par le P450 en radicaux libres capables d'attaquer les acides gras polyinsaturés membranaires [467]. La réaction de peroxydation qui se propage en cascade entraîne la dégradation des acides gras membranaires. Ceci provoque des altérations de la fluidité et le dysfonctionnement des systèmes de transduction du signal. L'une des conséquences les plus dramatiques de ces atteintes membranaires est la perte du contrôle des flux ioniques. L'entrée massive de  $\text{Ca}^{2+}$  ou de  $\text{Na}^{+}$  non compensée par le flux de sortie lié aux pompes  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase,  $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$  ATPase, entraîne des désordres souvent irréversibles.

# ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

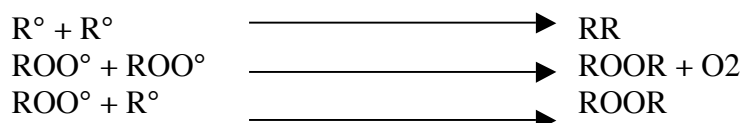
## INITIATION



## PROPAGATION



## TERMINAISON



- RH : acide gras  
R° : radical alkyle  
ROO° : radical peroxyde  
ROOH: hydroperoxyde d'acide gras  
ROOR : peroxyde

Figure 1 : Mécanismes de la peroxydation lipidique [325].

## A- II- 2- XENOBIOTIQUES ET ACTIVITE MITOCHONDRIALE

Les mitochondries assurent l'approvisionnement cellulaire en énergie par la  $\beta$ -oxydation couplée à la phosphorylation oxydative. Cette voie d'apport énergétique peut être secondaire lorsque la cellule, comme l'hépatocyte, est capable de produire de l'ATP par glycolyse, ou prépondérante lorsque l'activité glycolytique est faible comme c'est le cas pour les cellules rénales [78]. Une inhibition de la voie de la  $\beta$ -oxydation, comme la provoquent les tétracyclines, se traduit par l'accumulation des acides gras dans les mitochondries puis dans le cytoplasme des cellules. Ce phénomène décrit *in vivo* comme une stéatose microvacuolaire peut-être reproduit *in vivo* sur des

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

cultures d'hépatocytes. La respiration mitochondriale et la phosphorylation oxydative peuvent être inhibées par de nombreux toxiques et des mécanismes divers. Ceci se traduit par une diminution dramatique de la concentration cytoplasmique en ATP. Ce déficit cellulaire énergétique provoque un arrêt des pompes calciques et de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase, ce qui conduit à une rupture de l'homéostasie cellulaire aboutissant rapidement à la nécrose. L'hypoxie, c'est-à-dire la déficience d'apport d'oxygène, est la première cause d'inhibition de la respiration cellulaire, le plus souvent causée *in vivo* par une vasoconstriction. Elle est reproduite facilement *in vitro* en diminuant la concentration en oxygène par enrichissement en azote de l'atmosphère où les cultures sont placées. Un déficit énergétique aigu de la cellule peut également être obtenu par inhibition chimique de la synthèse d'ATP mitochondriale, soit par inhibition de la chaîne respiratoire, soit par découplage du transport des électrons avec l'ATP synthétase (H<sup>+</sup>-ATPase). NADH et FADH<sub>2</sub> sont des donneurs d'électrons dont le déficit provoque un arrêt de la respiration mitochondriale. Les méthodes *in vitro* peuvent être d'une grande utilité pour l'étude de ces mécanismes spécifiques de la toxicité. Les cultures cellulaires permettent d'étudier la dégradation des acides gras radioactifs et ainsi de montrer une inhibition de la β-oxydation. L'utilisation des mitochondries isolées permet d'analyser plus finement les mécanismes en jeu en faisant varier directement les paramètres d'homéostasie mitochondriale.

### **A- II- 3- XENOBIOTIQUES ET FONCTIONS LYSOSOMIALES**

Les lysosomes interviennent dans la dégradation de macromolécules et de complexe organiques. Certains toxiques en inhibant les enzymes de dégradation provoquent le stockage lysosomal de lipides (phospholipidose), ou de protéines. La phospholipidose est facilement

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

reproduite *in vitro* sur des cellules en culture après des traitements courts. Chez l'animal, cet effet ne s'installe qu'après plusieurs jours, voire semaines de traitement quotidien.

### **A- III- ETUDE TOXICOLOGIQUE D'UNE NOUVELLE MOLECULE**

L'étude toxicologique d'une nouvelle molécule fait aujourd'hui couramment appel à des expérimentations *in vivo*. Elle a pour but d'établir le risque encouru par l'homme, avant tout contact (administration *per os* ou voie sanguine, exposition cutanée ou des voies respiratoires, ...) qu'il s'agisse d'un médicament, d'un produit chimique, d'un polluant ou encore d'un pesticide. Il faut aboutir à des réponses rapides, fiables, d'un coût limité et ne nécessitant qu'un nombre réduit d'animaux. Depuis quelques années beaucoup s'interrogent sur la contribution potentielle des tests *in vitro* à l'établissement de ce risque. Mais comment définir un risque toxicologique potentiel pour l'homme à partir de critères de toxicité *in vitro* ? L'extrapolation des données suscite beaucoup d'interrogation. Néanmoins, il est aujourd'hui généralement admis que la contribution des tests *in vitro* peut-être essentielle dans différents domaines tel le tri (criblage) de molécules dans la phase initiale de leur découverte, l'élaboration de la structure la plus efficace de la molécule et bien sûr l'identification des mécanismes de toxicité. Pour aborder de telles études, il convient de définir l'approche *in vitro*. Il est clair qu'un test *in vitro* ne peut à lui seul remplacer le modèle animal, il peut seulement apporter des informations sur un type cellulaire, ou mieux sur un organe. Les tests *in vitro* reposent sur l'analyse individuelle de chaque composé, le recueil de toutes les données relatives à celui-ci, le constant dialogue avec les chimistes qui en assurent la synthèse et des études du mécanisme d'action *in vitro* complétés par une expérimentation *in vivo*. Cette stratégie est applicable à différents types de produits et donc utilisable par différentes industries pharmaceutiques, chimiques, cosmétiques...



# ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

---

## A- IV- LE FOIE ORGANE CIBLE POUR LES TOXIQUES

Le foie est le premier organe, après l'intestin, exposé aux effets indésirables des xénobiotiques et se trouve être ainsi une cible de choix pour leur action toxique qui peut être d'ordre primaire (liée à la toxicité immédiate du produit lui-même) ou d'ordre secondaire (liée à la conversion du xénobiotique en ses métabolites plus toxiques que la substance initiale). Cette transformation peut s'effectuer soit par une voie métabolique classique soit par une dérivation métabolique liée à l'épuisement des facteurs ou capacités nécessaires au maintien d'une activité normale. Les composés hépatotoxiques peuvent induire plusieurs types de lésions selon la dose et le mode d'administration. Des altérations modérées peuvent régresser tandis que des dommages sévères peuvent conduire à la nécrose cellulaire. L'administration d'une seule dose ou un traitement de courte période peuvent induire une stéatose, une cholestase, une inflammation ou une nécrose, alors qu'une administration répétée du toxique peut entraîner la formation d'une fibrose puis d'une cirrhose [568].

**La stéatose**, caractérisée par une accumulation intra-cytoplasmique de globules lipidiques associée à un gonflement de la cellule, représente le changement histologique le plus fréquemment observé lors d'une toxicité hépatique aiguë. C'est le cas notamment après administration de tétrachlorure de carbone [187]. À côté de ces altérations, diverses modifications cytoplasmiques et ou nucléaires peuvent être induites.

**La cholestase** résulte d'une altération du flux biliaire qui peut être provoquée par une diminution de la sécrétion biliaire au niveau de l'hépatocyte (cholestase intra-hépatique) ou par l'obstruction de l'arbre biliaire (cholestase extra-hépatique).

**L'inflammation** est relativement fréquente dans les zones nécrotiques.

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

**La nécrose** cellulaire se caractérise par des altérations irréversibles de la membrane plasmique conduisant à l'accumulation intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Na}^{+}$  et à la libération de  $\text{K}^{+}$  et d'enzymes cytosoliques. À l'échelle ultra structurale, le réticulum endoplasmique apparaît dilaté et désorganisé, les mitochondries sont gonflées et perdent leur capacité à générer de l'ATP. De même des altérations nucléaires sont observées ; le noyau devient pycnotique et se fragmente. L'autre type de mort cellulaire, ou **apoptose** encore appelée mort cellulaire programmée, survient également après administration de certains toxiques. L'apoptose se caractérise par l'apparition de corps acidophiles.

**La fibrose** est une des réponses les plus sévères du foie à la toxicité hépatique chronique. Elle se traduit par une désorganisation de l'architecture hépatique et conduit à la **cirrhose**. L'administration prolongée de nombreux toxiques, par exemple les aflatoxines, le tétrachlorure de carbone, l'éthanol, la galactosamine et le bromobenzène, peut produire une fibrose et une cirrhose [567]. La fibrose et la cirrhose sont associées à une accumulation importante de collagène. Ces différents types de lésions affectent différentes fonctions, certaines d'entre elles pouvant être révélées par des dosages sériques. Ainsi une augmentation de transaminases traduit une nécrose cellulaire, une élévation des phosphatases alcalines une cholestase.

### **A- V- FACTEURS INFLUENCANTS L'HEPATOTOXICITE INDUITE PAR LES XENOBIOTIQUES**

L'hépatotoxicité induite par les xénobiotiques peut être modulée par des facteurs physiologiques, nutritionnels, thérapeutiques et génétiques qui régulent l'expression des enzymes de biotransformation. Les activités des monooxygénases dépendantes du cytochrome P450 diffèrent entre le fœtus, le nouveau né et l'adulte et leur distribution intra-lobulaire change au cours de la

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

maturation du foie [403]. Des produits naturels comme la caféine, les indoles et l'alcool, peuvent induire certains cytochromes P450. Le jeûne ou un régime hyper glucidique pauvre en protéines diminue l'activité des cytochromes P450. Les activités de biotransformation sont inductibles par des médicaments comme la rifampicine, l'érythromycine et l'oméprazole. Elles sont diminuées dans des situations inflammatoires et infectieuses.

### **VI- DETOXICATION DES XENOBIOTIQUES**

Différents mécanismes, endogènes ou exogènes, peuvent assurer la détoxification des xénobiotiques [159,466]. Il peut s'agir de l'inhibition de l'activité métabolique, d'une interaction avec la fixation d'un composé à son récepteur, de l'apport d'antioxydants ou de piègeurs de radicaux libres ou encore d'une stabilisation membranaire. L'hépatocyte possède plusieurs mécanismes de défense contre les composés toxiques, qui peuvent intervenir simultanément. Ils incluent l'autoinactivation du cytochrome P450, l'inactivation des époxydes réactifs par les époxydes hydrolases ou leur conjugaison au glutathion, la réduction de la peroxydation lipidique par le glutathion, la glutathion peroxydase, les glutathions S-transférases et les vitamines C et E.

Divers composés exogènes ont été proposés comme agents hépatoprotecteurs. Certains d'entre eux sont des inhibiteurs des monooxygénases dépendantes des cytochromes P450. Toutefois, ils n'ont parfois qu'un intérêt limité en raison de leur propre toxicité : c'est le cas du SKF-525A, du pipéronyl butoxyde et de l'alpha-naftoflavone. D'autres composés comme le métrapone, la cimétidine, le disulfiram et son métabolite le diéthylthiocarbamate, peuvent être utilisés lors d'une intoxication d'origine chimique chez l'homme.

De nombreuses molécules naturelles ou synthétiques ont été testées comme antioxydants afin de limiter la peroxydation lipidique induite par les substances hépatotoxiques. Ces molécules

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

incluent les vitamines C et E, les prostaglandines, les composés d'origine végétale comme les flavonoïdes et la silymarine. Parmi les antioxydants synthétiques, on peut citer l'hydroxyanisole butylée et l'hydroxytoluène butylée.

### **A- VII- PHASES DU TRANSIT D'UN XENOBIOTIQUE DANS L'ORGANISME**

L'effet toxique d'un xénobiotique est d'autant plus grand que sa concentration dans l'organisme est plus forte. Cette concentration étant la résultante de l'équilibre entre les diverses phases du transit de ce xénobiotique : son absorption, sa distribution, sa métabolisation et son excrétion.

### **A- VIII- ROLE DU FOIE DANS LA BIOTRANSFORMATION DES XENOBIOTIQUES**

Le foie représente 2 à 5% du poids corporel chez l'adulte, 1400 à 1600 g chez l'homme, 10 g environ chez un rat de 180-200 g. Il possède une architecture relativement simple dont l'unité fonctionnelle est le lobule ou acinus ([217, 401]. Le foie est composé de plusieurs types cellulaires : les hépatocytes, les cellules sinusoidales (cellules de Kupffer et endothéliales, lipocytes ou cellules de Ito et lymphocytes résidents ou Pit cells), les cellules biliaires et les cellules mésenchymateuses et nerveuses. Les hépatocytes constituent près des deux tiers de la population cellulaire totale d'un foie de rat et environ 80% chez l'homme [139]. Les hépatocytes humains ont un volume double de celui d'un hépatocyte de rat ou de chien, leur diamètre est de 15 à 30  $\mu\text{m}$ . La plupart des cellules adultes sont polyploïdes. Dans le foie d'un jeune rat, 70% sont tétraploïdes, avec un ou deux noyaux et 20% sont diploïdes. Il n'existe pas de relation entre le degré de ploïdie et la localisation

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

intralobulaire des hépatocytes, contrairement à ce qui est observé pour les activités fonctionnelles. En effet, de nombreuses fonctions sont exprimées à des niveaux différents, voire exclusivement, dans l'une ou l'autre des zones intralobulaires [141]. Dans le foie adulte sain, le taux de renouvellement cellulaire est très faible, l'index mitotique chez le rat est d'environ 0,03% [65].

La plupart des xénobiotiques sont lipophiles, ils ne peuvent être éliminés sans être métabolisés au préalable en molécules plus hydrosolubles. Les enzymes de biotransformation sont habituellement classées en deux groupes. Les enzymes de phase I assurent les réactions d'oxydation, d'hydrolyse et de réduction, fournissant un groupement fonctionnel nécessaire à l'activité des enzymes de phase II. Cette étape appelée fonctionalisation rend les molécules moins hydrophobes et permet leur conjugaison. Les oxydations par les monooxygénases dépendantes des cytochromes P450 sont les principales enzymes de phase I. Les enzymes de phase II comprennent les UDP-glucoronyl-transférases, les sulfotransférases, les glutathion S-transférases et les époxydes hydrolases. De nombreux facteurs influencent l'activité des enzymes de biotransformation : l'âge, le sexe, le statut nutritionnel et les maladies hépatiques.

### **A- IX-           MODELES EXPERIMENTAUX**

Les études conduites chez l'animal permettent de recueillir des informations importantes mais les différences entre espèces à la fois dans les voies et dans les vitesses de biotransformation sont souvent grandes, notamment entre les animaux de laboratoire et l'homme. De plus, *in vivo*, le métabolisme des xénobiotiques est soumis à des régulations complexes impliquant divers facteurs endogènes et exogènes, ce qui rend délicate la distinction entre les effets primaires et secondaires induits par un toxique. Ces limites que présentent les études *in vivo* expliquent sans doute l'intérêt

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

suscité par les modèles *in vitro* lors du criblage toxicologique des molécules et surtout pour analyser des mécanismes par lesquels une molécule induit des lésions cellulaires au niveau du foie.

### **A- X- L'IN VIVO ET L'IN VITRO**

L'animal est traditionnellement pris comme modèle expérimental *in vivo* pour des études de toxicologie ou de pharmacologie, aussi bien pour des expériences à court terme qu'à long terme.

Le rat parmi d'autres animaux (hamsters, cobayes, souris, singes, ...) est très utilisé dans le domaine de toxicologie. Les études de toxicité, particulièrement la détermination des doses journalières admissibles d'un xénobiotique ou de la dose thérapeutique d'un médicament, s'effectuent sur l'animal avant l'extrapolation à l'homme. Le modèle *in vivo* demeure intéressant tant qu'il s'agit de se limiter à un résultat d'ordre final (exemple : la réponse à un effet toxique d'un produit par une mortalité ou un changement de poids de l'animal). Mais pour élucider le mécanisme des modifications biochimiques par lesquelles ce produit toxique a causé la toxicité ou son devenir dans l'organisme, l'animal devient un modèle inefficace puisque la plupart des indices de toxicité sur l'animal entier donne l'effet final de toxicité. L'action au niveau cellulaire, subcellulaire ou moléculaire avant l'effet final ne peut être élucidé que sous forme d'hypothèse en faisant des déductions. *In vitro*, le mécanisme d'action du xénobiotique peut-être élucidé sous des conditions strictes et sur la cible privilégiée. Il est facile de mesurer ou de contrôler les effets biologiques par microscopie ou par des méthodes biochimiques, d'élucider la modalité d'interaction entre le xénobiotique et le tissu au niveau cellulaire, subcellulaire ou moléculaire. L'étude au niveau moléculaire est facilitée par la détermination des organites (microsomes, mitochondries, ...), ADN, ARN et protéines. L'étude des activités enzymatiques, des voies métaboliques d'un xénobiotique et l'évaluation des métabolites de ce dernier s'effectuent plus aisément *in vitro* que chez l'animal

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

entier. La nature du modèle expérimental et la facilité de sa manipulation permet l'étude des modifications des fonctions d'un organite en tant qu'indicateur sensible et spécifique de la toxicité. Il est aussi important de noter la rapidité et le coût inférieur des méthodes *in vitro* par rapport aux méthodes *in vivo*. L'emploi en toxicologie de méthodes alternatives qui comprend en réalité toute méthodologie autre que l'expérimentation animale, pourrait supprimer ou diminuer l'utilisation des animaux de laboratoire. Différents modèles d'études *in vitro* sont actuellement disponibles [157,158]. Actuellement, la toxicologie fait une place de plus en plus large à l'expérimentation *in vitro* en particulier, aux modèles cellulaires ou toxicologie cellulaire *in vitro*. Celle-ci est utilisée pour le criblage de nouvelles molécules mais aussi et surtout pour prédire la nature des lésions induites par les composés toxiques ou pour identifier les mécanismes impliqués. Actuellement les méthodes *in vitro* représentent la quasi-totalité des méthodes alternatives. Le terme *in vitro* globalise l'utilisation d'organes, de coupes, de culture de cellules, de cellules isolées et d'organites cellulaires.

### **A- XI- L'IN VITRO ET L'ETHIQUE**

Les raisons du développement de l'*in vitro* sont de deux sortes : technologiques et éthiques. En effet, les cultures cellulaires ont atteint un très haut niveau de technicité. Les causes éthiques sont en relation avec la prise de conscience des pays industrialisés pour la souffrance animale non indispensable aux progrès de la santé des humains. L'expérimentation animale était un préalable avant toute thérapie sur l'homme. Or, les progrès de la médecine avec la mise sur le marché de nombreux médicaments nouveaux, efficaces mais souvent accompagnés d'accidents secondaires potentiels, ont conduit à l'utilisation grandissante d'animaux de laboratoire. Ces deux raisons contradictoires, éthique animale et emploi accru d'animaux d'expérience, ont créé un climat propice

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

au développement des méthodes alternatives. Les ligues antivivisection ont influencé la politique des pays industrialisés et dans divers pays se sont créés des centres dédiés au développement de ces méthodes. Parmi ces centres : le John Hopkins Center aux USA, le FRAME (Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments) en Angleterre et des initiatives du ministère de la Recherche et de l'OPAL (Œuvre pour la Protection des Animaux de Laboratoire). Récemment, la communauté européenne a créé l'ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods) à Ispra en Italie. Ces différents centres sont orientés vers la toxicologie *in vitro* qui est réalisée soit sur des organes ou tissus en survie, soit sur des cultures cellulaires d'un seul type, ou sur des co-cultures constituées de deux types comme la culture d'hépatocytes et de cellules épithéliales hépatiques RECL), ou de plusieurs types reproduisant une véritable structure tissulaire comme la peau reconstituée. La culture cellulaire *in vitro* a été utilisée très rapidement en toxicologie, pour un pré-criblage des médicaments et pour l'étude du mécanisme d'action. Mais il est évident que, dans l'état actuel de nos connaissances, le passage à l'*in vivo* s'avère indispensable avant la mise sur le marché des médicaments. Les stratégies proposées par les différentes firmes industrielles confrontées à l'étude toxicologique d'un produit nouveau utilisent successivement des méthodes *in vitro* et *in vivo*. Les méthodes *in vitro* demeurent extrêmement intéressantes dans la mesure où elles entraînent normalement une diminution de l'utilisation d'animaux de laboratoire.

### **A- XII- LES LESIONS TOXIQUES ET MORT CELLULAIRE**

La compréhension de la succession des mécanismes biochimiques qui conduisent la modification moléculaire initiale au dysfonctionnement fonctionnel, et à son stade ultime, la mort cellulaire, reste une des préoccupations essentielles de la toxicologie moderne. Elle est particulièrement importante dans les études *in vitro*, pour comprendre ou prévoir les effets toxiques



## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

observés *in vivo*. Sur le plan moléculaire, des modifications de la structure des molécules biologiques, causées par l'interaction directe ou indirecte avec l'agent toxique, peuvent être détecté. Sur le plan biologique, ce sont les altérations fonctionnelles des cellules et leur retentissement sur l'homéostasie de l'individu qui sont observées. Les biologistes ont longtemps cru qu'il existait une relation directe entre un type de modification moléculaire et son retentissement biologique, et qu'il suffisait de comprendre la nature de cette altération pour élucider l'ensemble. Cependant, l'observation du fait que des dommages cellulaires sévères, provoqués par diverses toxiques, n'entraînent pas obligatoirement la mort de toute la population cellulaire exposée, montre que d'autres facteurs de protection et de réparation, particuliers à chaque cellule, sont à prendre en compte. Ce n'est que lorsque ces défenses cellulaires sont débordées qu'un processus dégénératif s'installe, aboutissant à la mort cellulaire. On considère actuellement que la cellule peut mourir par deux types de processus distincts : la nécrose et l'apoptose.

La nécrose, qui apparaît généralement après une lésion cellulaire, d'origine chimique ou physique, est la résultante d'un processus dégénératif, observable dans des cas de toxicité.

L'apoptose, ou mort programmée, est un processus actif, dépendant de l'expression de gènes spécifiques conduisant à l'autodestruction cellulaire. Elle joue un rôle important au cours de l'embryogenèse et dans les renouvellements tissulaires. Chez l'embryon humain, les doigts sont d'abord palmés, puis cette palmure interdigitale disparaît, les cellules de ces tissus transitoires meurent par apoptose. Elle permet l'élimination des cellules génétiquement lésées et des cellules ayant une prolifération anormale. Elle règle l'équilibre dynamique entre les cellules qui meurent et les cellules qui apparaissent, empêchant ainsi un développement hypertrophique de l'organisme. L'apoptose est donc non limitée à une situation pathologique, elle est comme la mitose ou la différenciation, un phénomène normal qui régule le nombre de cellules dans le tissu adulte [546].

# ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

---

## A- XII- 1- HISTORIQUE

Nous avons longtemps pensé que la mort des cellules ne pouvait résulter que d'agressions, de maladies ou de vieillissement. C'est l'étude de la toute première étape de la vie qui a progressivement révélé ce phénomène d'apoptose. Durant le développement de l'embryon, passant de l'œuf à un être pluricellulaire complexe, surviennent, en absence de toute maladie et de tout vieillissement des épisodes massifs de mort cellulaire. La mort cellulaire fait partie intégrante du programme normal de développement de l'embryon et son premier rôle reconnu fut de modeler la forme changeante de l'embryon par élimination de tissus transitoires. Ainsi, au cours du développement embryonnaire, le langage cellulaire, l'émission ou la réception de signaux spécifiques, détermine la survie ou la mort des cellules. C'est vers les années 1972 que Kerr *et al.*, ont remarqué le caractère stéréotypé de la mort cellulaire programmée très différent de l'aspect anarchique de la nécrose. Ils ont décrit ces caractéristiques sous le terme d'apoptose d'après le mot grec désignant la chute des feuilles en automne [211].

Bien avant cette date l'apoptose a été découverte par d'autres auteurs dans différentes maladies du foie aussi bien chez l'homme que chez l'animal, elle était nommée : Councilman bodies ou acidophilic bodies [35 ,209]. Depuis les années 1990 elle est un sujet d'un grand intérêt au niveau recherche notamment en immunologie et en oncologie.

L'existence de deux types de mort cellulaire morphologiquement distinct vient de l'étude histochimique des changements dans les lysosomes dans l'ischémie hépatique [208]. Après ligature des branches de la veine porte qui alimente le lobe gauche et médian du foie de rat, il a été noté, pendant la période de régression du parenchyme, des hépatocytes individuels éparpillés qui se convertissaient à de petites masses rondes cytoplasmiques, parmi elles, certaines contenaient de minuscules parcelles de chromatine. Ces structures sont clairement une manifestation de mort

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

cellulaire, mais leur apparence histologique était différente des cellules nécrotiques, et sans inflammation associée comme c'est le cas de la nécrose. Les lysosomes dans les petites masses rondes identifiées par coloration laisse suggérer qu'ils soient encore intacts. Les lysosomes dans les cellules nécrotiques sont cassés et le produit de réaction enzymatique est dispersé dans le cytoplasme. Des masses rondes cytoplasmiques apparemment identiques ont été détectées en nombre petit dans le foie de rat sain. La microscopie électronique a été ensuite utilisée pour étudier le développement de ces masses rondes [209,210]. Il a trouvé qu'elles contiennent des organites dont la structure est bien préservée et parfois des morceaux de chromatine compacte. Elles se forment par un processus de condensation et de bourgeonnement de l'hépatocyte (Fig. 2) [553]. Le terme d'origine donné : "shrinkage necrosis" [210] semble indésirable pour ce phénomène et le nom apoptose était proposé, montrant que la morphologie de cette mort cellulaire joue un rôle opposé à la mitose dans la régulation de la taille des tissus, qui montre bien sa signification cinétique [211].

### **A- XII- 2- APOPTOSE /NECROSE**

L'apoptose est un type de mort cellulaire fondamentalement différent de la mort dégénérative ou nécrose dans sa nature et sa signification biologique. Ainsi, il est évident que l'apoptose est un processus actif de la cellule dans sa propre destruction génétiquement dirigée. La nécrose au contraire est essentiellement accidentelle où la mort cellulaire dépend exclusivement de l'action de facteurs externes comme des agents toxiques et non d'un phénomène interne. L'appui du concept d'apoptose provient des études ultra structurales, et biochimiques.

L'intérêt de l'apoptose vient de la découverte que cette forme de mort cellulaire dépend de l'expression de plusieurs gènes qui peuvent induire ou inhiber cette destruction cellulaire [117,546].

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Cependant une étroite frontière divise les deux formes de mort cellulaire et certaines drogues peuvent induire l'apoptose et/ou la nécrose. La nécrose est un phénomène de mort cellulaire connu depuis longtemps et associé à diverses maladies. La membrane des cellules est lésée par un poison ou par un agent infectieux ; les cellules gonflent ; la membrane se rompt et les enzymes toxiques contenues dans les cellules sont libérées ; ces substances tuent les cellules environnantes, déclenchant une réaction inflammatoire et un tissu fibreux anormal se forme qui dénature l'architecture du tissu de l'organe.

La mort cellulaire programmée est de nature très différente : des millions de cellules meurent en quelques heures sans entraîner ni inflammation ni lésion dans les tissus où elles disparaissent. Parce qu'elle constitue un phénomène rapide et discret, la mort cellulaire programmée est difficile à détecter car c'est un phénomène rapide. La cellule qui commence à mourir se détache des cellules voisines, puis se désintègre de façon ordonnée : son noyau se condense, puis se fragmente, les chromosomes et le génome se brisent en fragments réguliers et le cytoplasme se divise en ballonnets, rapidement ingérés par les cellules voisines. La surface cellulaire prend un aspect « bouillonnant », mais la membrane de la cellule ne se rompt pas, évitant toute libération de constituants intracellulaires toxiques dans l'environnement. L'expression de certaines molécules à la surface de la cellule mourante permet aux cellules voisines ou à des macrophages de les identifier et de les ingérer. Différence essentielle entre apoptose et nécrose : la mort programmée résulte non pas d'une destruction cellulaire mais de la mise en œuvre par la cellule elle-même d'un processus d'autodestruction ; un concept nouveau : celui de suicide cellulaire. On pense aujourd'hui que les armes de l'autodestruction existent, sous forme inactive, dans la plupart des cellules prêtes à être utilisées dès qu'elles reçoivent le signal adéquat.

# ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

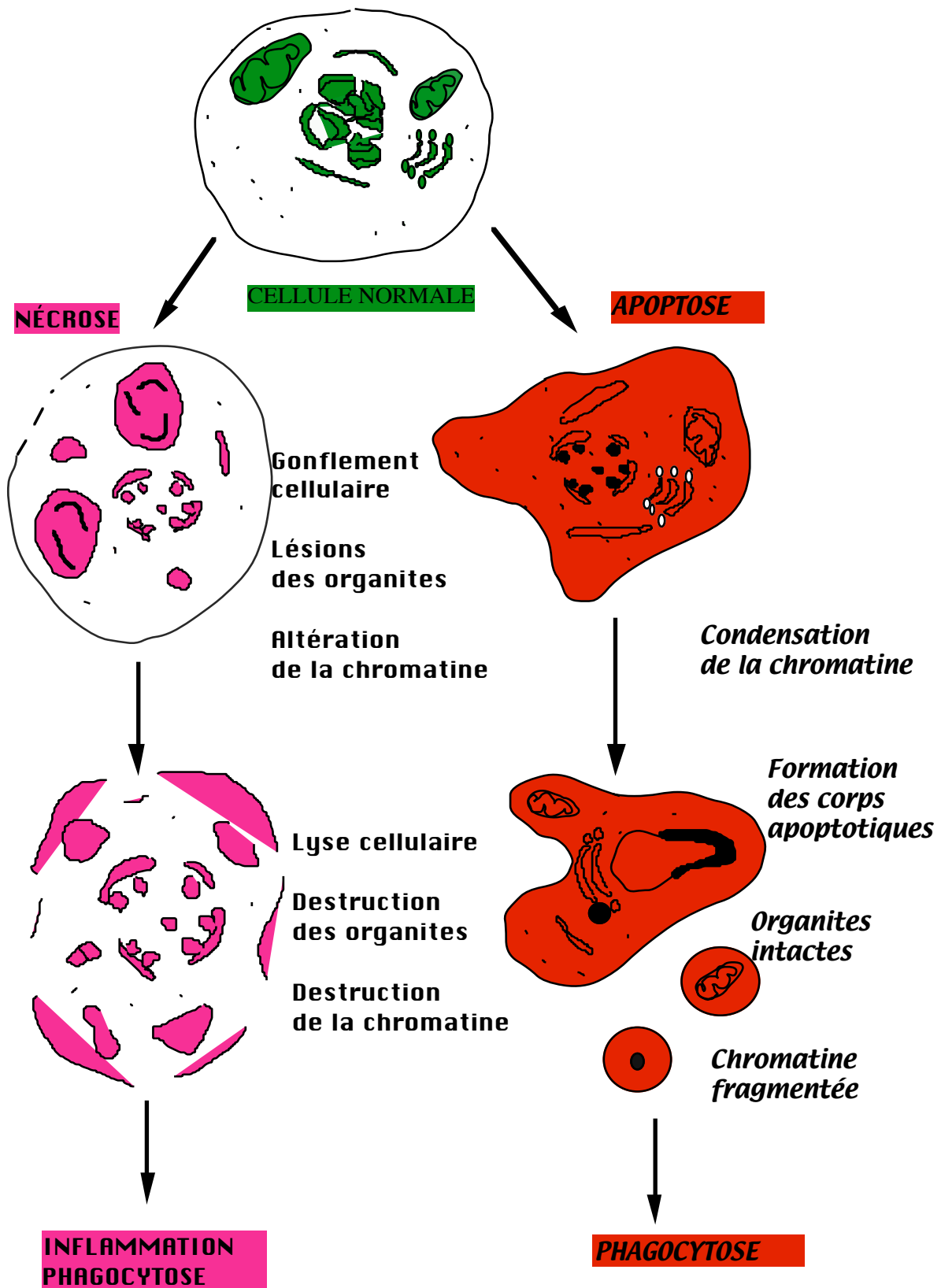


Figure 2. Séquence des modifications ultrastructurales conduisant à la nécrose et à l'apoptose.

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

### **A- XII- 3-            NECROSE**

Les étapes morphologiques de la nécrose sont bien connues. Dans un premier temps, la cellule et les organites cellulaires gonflent, en particulier les mitochondries. On considère d'ailleurs, que la formation de renflements membranaires (blebbing) est un marqueur d'une souffrance cellulaire d'origine toxique et d'une évolution vers la nécrose [176,259,288,512]. La chromatine nucléaire se fragmente en amas compact de contours souvent irréguliers nettement visibles au microscope électronique. Dans un second temps, les membranes cellulaires éclatent et la cellule se lyse en libérant son contenu. Les premières étapes peuvent être réversibles, le point de non retour semblant être atteint quand la membrane devient complètement perméable. La destruction de l'intégrité membranaire conduit au largage d'enzymes lysosomiales qui accélèrent la lyse cellulaire. Quand la nécrose survient in vivo, elle est en général accompagnée de phénomènes inflammatoires et donc facilement identifiables. De nombreux produits cytotoxiques sont capables d'engendrer une mort cellulaire par nécrose et la lésion initiale peut donc être très variable. Cependant, dans la cascade des événements irréversibles qui surviennent dans ce processus, des modifications communes sont observées, en particulier une modification irréversible de l'homéostasie calcique paraît être un facteur déterminant [42]. Néanmoins, ce n'est pas un facteur suffisant, puisqu'on retrouve également cette élévation dans les premières étapes du processus d'apoptose. Un autre événement caractéristique qui apparaît dans la phase finale est la dégradation progressive de la chromatine nucléaire qui s'accompagne d'une fragmentation aléatoire de l'ADN, nettement repérable sur gel d'agarose où l'on observe une large bande diffuse (smear).

# ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

---

## A- XII- 4- APOPTOSE

### A- XII- 4- 1- Aspects morphologiques

L'apoptose appelée la mort cellulaire programmée est une forme de mort cellulaire caractérisée par plusieurs aspects morphologiques et biologiques différents de la nécrose. Pendant le processus apoptotique, les cellules se rétractent et perdent contact avec les cellules voisines, la chromatine devient compacte et s'agrège en masse très dense à la périphérie du noyau [210,211,553]. Le cytoplasme se condense également tandis que les membranes plasmique et nucléaire forment des digitations qui vont conduire à la formation de fragments nucléaires et cytoplasmiques : les corps apoptotiques. A l'intérieur de ces membranes, les organites cellulaires semblent intacts. Dans un tissu, les corps apoptotiques sont rapidement phagocytés et dégradés par les cellules voisines ou par des macrophages sans que des phénomènes inflammatoires ne se manifestent [106,449]. Un élément important de l'apoptose est le maintien de l'intégrité des fragments subcellulaires, évitant ainsi la libération de composés intracellulaires potentiellement toxiques. Ce qui explique l'absence d'une réponse inflammatoire et qu'il n'y a pas de fibrose visible après la mort cellulaire. Au contraire, durant la nécrose, le résultat d'un traumatisme sévère, les cellules endommagées gonflent et perdent leur intégrité membranaire et le résultat de cette cytolysse s'accompagne d'une réponse inflammatoire [433] et à distance par la possibilité du développement d'une fibrose avec modification de l'architecture de l'organe. Il faut noter que les deux processus apoptose et nécrose peuvent survenir en parallèle, tous deux contribuant à la mort cellulaire. La phagocytose des cellules condensées ou des corps apoptotiques fait de l'apoptose un événement rapide d'environ trois heures [54].

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

### **A- XII- 4- 2- Aspects biochimiques**

Les événements biochimiques se produisant au cours de l'apoptose commencent à être bien connus [506]. La dégradation de l'ADN a été le plus largement étudiée. En effet, en même temps que la chromatine se condense, l'ADN est coupé en fragments d'environ 185 paires de base [553] qui sont détectables par électrophorèse sur gel d'agarose. L'apoptose est un phénomène actif caractérisé par une augmentation de synthèse d'ARN et de protéines. Cette augmentation de la synthèse reflète une augmentation de l'activité de plusieurs enzymes nucléaires et cytoplasmiques. Une de ces enzymes est une endonucléase  $\text{Ca}^{+2}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  dépendante, dont l'identification est encore incertaine et la nature de(s) l'endonucléase(s) responsable(s) des modifications morphologiques dans le noyau sont en cours d'être identifiées. Actuellement l'intérêt est porté aussi sur un groupe d'enzymes composé de protéases [295] qui peuvent agir sur des protéines nucléaires. L'augmentation de l'activité des protéases et des endonucléases est accompagnée d'une profonde altération de l'ADN du noyau, mais pas l'ADN des mitochondries. La dégradation de l'ADN apparaît prendre place en deux étapes : l'ADN est en premier clivé en fragments de 300 et 50 kilo base (kb) [355] et deuxièmement en petits fragments de 180 à 200 paires de bases (pb) qui donne de typiques bandes en électrophorèse [553]. Ce dernier changement décrit pour la première fois par Wyllie dans des thymocytes apoptotiques représente une marque biochimique de l'apoptose [79]. L'apoptose peut être induit dans des cellules anucléées, ce qui suggère que ni l'activation de l'endonucléase, ni la dégradation de l'ADN, ni le signallement nucléaire ne soient nécessaires pour l'induction et l'exécution de la mort cellulaire programmée [454]. La fragmentation d'ADN n'est pas universellement observée durant l'apoptose et survient plutôt au stade tardif de l'apoptose. Le clivage de l'ADN peut être démontré in situ en utilisant la technique TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated deoxyuridine triphosphate nick-end-labelling). La méthode



## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

de cytométrie en flux, basée sur l'ADN réduit marqué et les cellules rétractées, est intéressante dans la détection et la quantification de routine de l'apoptose. Cette méthode est basée sur le fait que la fragmentation de l'ADN observée durant l'apoptose est associée à la diminution de l'ADN lié à un colorant comme l'iodure de propidium. L'agrégation des organites, la condensation du cytoplasme, la rétraction de l'ensemble de la cellule semble avoir comme base moléculaire l'induction de la transglutaminase (TG) cytoplasmique, une enzyme calcium dépendante, qui agit en créant des bridges entre les résidus glutamine et lysine [123,382]. Cette enzyme semble exprimée spécifiquement dans les cellules apoptotiques [123] et semble intervenir dans la formation des structures rigides et serrées des corps apoptotiques qui contiennent beaucoup de protéines reliées. L'expression de la TG, qui n'est pas universellement observée durant l'apoptose, est trouvée dans les cellules endothéliales, et dans les cellules du muscle lisse du foie et dans les hépatocytes seulement s'ils sont en cours d'aller vers l'apoptose [382]. La reconnaissance spécifique par les macrophages des corps apoptotiques suggère fortement une altération de la composition de la membrane plasmique, et l'expression de plusieurs marqueurs à la surface des membranes externes des cellules apoptotiques reconnaissables pour la phagocytose [106,107,449], la phagocytose rapide des corps apoptotiques étant une part inhérente du programme apoptotique.

### **A- XII- 4- 3- Perturbations biochimiques et toxicité**

Plusieurs mécanismes jouent un rôle déterminant dans la cascade des évènements qui conduisent à la nécrose ou à l'apoptose. Il s'agit de l'élévation anormale de la concentration cytosolique en  $Ca^{2+}$  libre, la déplétion en ATP et l'altération de l'état d'oxydoréduction liée à l'effondrement du taux de glutathion. Ces différentes perturbations sont souvent liées et peuvent enclencher les mécanismes de cytotoxicité aiguë.

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

---

### A- XII- 4- 3- 1- Calcium et cytotoxicité

Le rôle du calcium dans la régulation de nombreuses activités cellulaires est maintenant bien établi. Un déséquilibre ou une rupture de cette régulation, par une augmentation non contrôlée du calcium cytosolique, est souvent le premier événement dans le développement de la toxicité. L'accumulation du calcium cytosolique ( $Ca^{2+}_i$ ) serait responsable de neurotoxicités des métaux lourds comme le plomb ou le mercure et de certaines molécules organiques [229]. Une élévation de la concentration en  $Ca^{2+}_i$  contribue également à la toxicité de différents agents hépatotoxiques comme le tetrachlorure de carbone, le diquat, l'acétaminophène [320,516] et les quinones [113]. Normalement, la concentration de  $Ca^{2+}_i$  est maintenue grâce à un contrôle très strict du transport membranaire et par le maintien des réserves internes situées dans les mitochondries ou le réticulum endoplasmique. L'accumulation de  $Ca^{2+}_i$  peut résulter d'une augmentation de l'entrée de l'ion à travers les canaux membranaires, d'un largage anormal à partir des réserves internes en particulier les mitochondries, ou d'une inhibition des mécanismes de sa sortie. La durée et l'amplitude de cette augmentation sont certainement des points critiques dans le développement de la toxicité. L'activation d'enzymes dépendantes du  $Ca^{2+}$  et impliquées dans des processus de dégradation joue un rôle essentiel. Des protéases comme les calpaïnes, qui sont cytosoliques, sont activées par le  $Ca^{2+}$  [332]. L'activité de ces enzymes protéolytiques entraînerait, en particulier, la dégradation des protéines du cytosquelette et des protéines d'encrage au niveau membranaire, provoquant la formation de protrusion cytoplasmique (blebs) caractéristiques des atteintes toxiques précoces [344].

Deux autres groupes d'enzymes sont activés spécifiquement par le  $Ca^{2+}$  et jouent un rôle essentiel dans l'évolution vers la nécrose ou l'apoptose. Il s'agit de certaines phospholipases et endonucléases. Les phospholipases A2 sont calcium et calmoduline dépendantes. Elles régulent le

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

largage d'acide arachidonique à partir des phospholipides membranaires. Si l'augmentation de la concentration  $Ca^{2+}_i$  est soutenue, ceci entraîne de graves altérations de la membrane plasmique [345]; Trump, 1987 #261]. L'apoptose implique l'activation d'endonucléases spécifiques dépendantes du  $Ca^{2+}$  et du  $Mg^{2+}$ . Ceci a été étudié dans l'apoptose induite par les glucocorticoïdes sur les thymocytes [Wyllie, 1980 #3811; [302]. La fragmentation de l'ADN est précédée d'une augmentation soutenue de la concentration en  $Ca^{2+}_i$ . Le phénomène peut être inhibé par des chélateurs de  $Ca^{2+}$  et des antagonistes de la calmoduline.

### **A- XII- 4- 3- 2-      Glutathion et toxicité**

Le glutathion réduit (GSH) se trouve dans toutes les cellules eucaryotes. Il est localisé essentiellement dans le cytosol mais également dans les mitochondries et le noyau. Sa concentration est très variable d'un type cellulaire à l'autre. C'est un puissant nucléophile qui joue un rôle protecteur essentiel contre les radicaux libres, les oxydants et les molécules à caractère électrophile. Il intervient en tant que cofacteur de la glutathion peroxydase qui permet la dégradation de  $H_2O_2$  au cours des processus d'oxydation cellulaire. Le GSH est impliqué dans les réactions de phase II qui permettent l'inactivation des métabolites actifs des xénobiotiques par conjugaison grâce au glutathion-S-transférase. La concentration en GSH et en glutathion-S-transférase est ainsi particulièrement élevée dans les hépatocytes [104,309]. La déplétion en GSH expose donc la cellule à ces diverses agressions toxiques et les ressources cellulaires en GSH jouent un rôle déterminant dans la résistance aux agressions, en particulier au stress oxydant [121,435]. De nombreux agents électrophiles sont capables d'induire une déplétion en GSH. L'adriamycine, le diéthylmaléate (DEM), le bromobenzène sont, par exemple, bien connus pour leur capacité à provoquer une forte déplétion de GSH dans les cellules en culture, de la même façon que les agents capable d'induire un

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

stress oxydatif tels que l'hyperoxie, l'ozone, le dioxyde d'azote. Bien qu'un pool résiduel de GSH identifié comme étant mitochondrial subsiste généralement [311,369], l'association de l'adriamycine avec le diéthylmaléate induit une déplétion totale de l'hépatocyte en GSH [17]. Il est donc important de pouvoir déterminer par dosage la concentration en GSH et le rapport GSH/GSSG. C'est un des points essentiels de l'évaluation du statut antioxydant de la cellule qui doit être complété par la détermination de l'activité des enzymes impliquées dans la défense antiradicalaire (superoxyde dismutase, catalase).

### **A- XII- 4- 3- 3- Déplétion en ATP et toxicité**

Cette déplétion ainsi que la diminution du rapport ATP/ADP sont à l'origine de troubles concernant toutes les activités cellulaires qui nécessitent de l'énergie. Elle conduit à un arrêt rapide des fonctions essentielles de la cellule. L'origine de cette déplétion est souvent liée à une atteinte mitochondriale. Cette déplétion, si elle apparaît précocement, entraîne rapidement l'élévation de la concentration en  $Ca^{2+}_i$  par inhibition des ATPases impliquées dans le contrôle de l'homéostasie calcique. Il est généralement admis que la destruction de l'intégrité membranaire, en particulier de la membrane plasmique, est un événement critique qui peut conduire à la mort cellulaire, *in vitro* comme *in vivo*. Des tests sur cultures cellulaires permettent d'évaluer cette atteinte membranaire et la perte de viabilité. Cependant les rôles de la déplétion en groupements thiol et surtout la modification de l'homéostasie calcique dans les mécanismes qui conduisent à la mort cellulaire sont encore sujets à controverses et nécessitent de continuer des investigations *in vivo* et *in vitro*.

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

### **A- XII- 4- 4-            Contrôle génétique de l'apoptose**

L'apoptose est marquée par les changements dans l'expression des gènes capables d'induire ou d'inhiber la mort cellulaire programmée. Ces gènes ont été d'abord identifiés dans le nématode *Caenorhabditis elegans* [117]. C'est ce nématode, un des plus petits organismes pluricellulaires (un ver transparent), qui a permis d'identifier vers les années 1987 la première preuve de suicide cellulaire commandé par des gènes. L'analyse de mutants génétiques a permis d'identifier trois gènes qui jouent un rôle essentiel dans la régulation de la mort cellulaire : *ced-3* et *ced-4* dont l'expression provoque la mort cellulaire et *ced-9* dont l'expression empêche cette mort. Ainsi certains gènes ont pour fonction d'interrompre prématurément la vie d'une cellule et d'autres de lui permettre de survivre. Les gènes de survie ont un effet dominant, c'est seulement en l'absence de molécules codées par les gènes de survie que les produits des gènes tueurs entraînent le suicide.

Récemment plusieurs gènes ont été découverts dans les cellules mammifères [295,407]. Le proto-oncogène *Bcl-2* (de B-cell lymphoma/leukemia 2, *ced-9* son homologue chez *C. elegans*) prolonge la survie cellulaire par inhibition de la mort programmée des cellules. La protéine *Bcl-2*, une protéine de 25-26 kDa, localisée dans la membrane externe du noyau et de la mitochondrie et sur le reticulum endoplasmique [270,408], peut agir comme antioxydant puisque *in vitro*, elle inhibe l'apoptose induite par  $H_2O_2$  [181]. La suppression de *Bcl-2* conduit à la survie de cellules qui doivent normalement mourir. Normalement les cellules ont besoin de signalement par des molécules sécrétées par d'autres cellules pour éviter l'apoptose. Autrement, à défaut, elles meurent. Cette mort par défaut peut être bloquée par *Bcl-2* et le mécanisme précis par lequel il inhibe l'apoptose reste mal connu. *Bcl-2* est régulée par les gènes de la famille *Bcl-2* incluant *Bcl-x*, *Bax*, *Bak* et *Bad*. *Bcl-x* inhibe aussi l'apoptose, *Bad*, *Bak* et *Bax* peuvent dimériser avec *Bcl-2* ou *Bcl-x* en inhibant leur fonction et induisent l'apoptose. Quoique l'expression tissulaire de *Bak*, *Bad* et

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

Bcl-x reste incomplètement caractérisée, Bax a été identifié dans le foie, le pancréas, l'estomac et dans le gros intestin. Le gène c-myc a été associé à la croissance et la prolifération cellulaire [71]. L'expression de c-myc est nécessaire pour l'entrée en phase S du cycle cellulaire et l'inhibition de son expression est associée à la quiescence cellulaire. L'expression anormale de c-myc a été impliquée dans la carcinogenèse. L'expression de c-myc a été aussi liée à l'apoptose. L'expression de c-myc dans les cellules d'hépatome conduit à une mort cellulaire montrant des traits apoptotiques. Les mécanismes moléculaires qui régulent ces fonctions opposées de la protéine c-myc restent obscurs.

Le suppresseur de tumeurs p53 est un régulateur positif de l'expression de Bax et un régulateur négatif de l'expression de Bcl-2. Le gène p53 et sa protéine peuvent induire l'apoptose [266,558], mais cette action reste à confirmer dans l'apoptose hépatocytaire [453]. L'inactivation du gène p53 par une délétion ou une mutation joue un rôle critique dans une large variété de tumeurs humaines, la carcinome hépatocellulaire inclus. La principale fonction de p53 apparaît dans la réponse cellulaire à un dommage de l'ADN, ceci en prévention à une accumulation potentielle de mutations oncogéniques ou d'une instabilité génomique [20]. De ce rôle de p53 comme un gardien du génome [248] provient la base de son activité anti-tumorale. L'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 [204,205] et l'apoptose [74,256] ont été montrés dépendants de la fonction de p53 normale. P53 active la transcription de plusieurs gènes dont les produits sont impliqués dans la réparation de l'ADN ou dans l'apoptose incluant Bcl-2/Bax,  $\alpha$ -TGF et CD-95 [204,331]. Les gènes inducteurs, comme p53, permettent d'orienter les cellules anormales vers l'apoptose empêchant ainsi une prolifération cellulaire anarchique. Si l'ADN d'une cellule est endommagé, la protéine p53 bloque le cycle, afin de laisser à la cellule le temps de réparer l'ADN. Le passage en phase S étant inhibé, l'ADN peut alors, soit être réparé, l'action de p53 s'interrompt et le cycle reprend, soit ne pas être

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

réparé et la cellule est orientée vers l'apoptose. Certains cancers sont dus à un déficit en protéines p53.

L'homme a des gènes très semblables aux gènes *ced-3*, *ced-4* et *ced-9*. Ainsi les gènes qui contrôlent le suicide cellulaire ont été conservés au cours de l'évolution. On a longtemps pensé que ces programmes de suicide cellulaire n'étaient opérationnels que pendant la période du développement embryonnaire. Ce sont les recherches sur les mécanismes de certaines maladies, comme le cancer et le SIDA, qui ont révélé que les programmes de suicide cellulaire continuaient à jouer un rôle déterminant tout au long de l'existence. Toutes les cellules de mammifères étudiées jusqu'à présent, qu'elles proviennent d'un embryon, d'un enfant ou d'un adulte, s'autodétruisent dès qu'elles sont privées de contacts avec d'autres cellules. La survie de chacune des cellules de l'organisme dépend de la réception permanente ou à intervalles réguliers de signaux de survie, émis par d'autres cellules et qui empêchent la mise en route du programme du suicide cellulaire. Un tel mode de fonctionnement lie étroitement le destin de chaque cellule à celui de l'organisme tout entier. Il permet à l'organisme d'adapter la taille d'une population cellulaire à ses besoins : par exemple, lors d'une infection, le nombre des lymphocytes augmente brutalement, mais une fois l'infection jugulée, la situation se normalise par un phénomène massif de suicide cellulaire qui n'épargne qu'un petit pourcentage de lymphocytes spécifiques de l'agent infectieux, garant de la mémoire immunologique. Toute cellule qui reçoit les signaux de multiplication s'autodétruit, sauf si elle reçoit en même temps, ou auparavant, des signaux de survie, qui déclenchent l'expression des gènes réprimant le suicide cellulaire, tels que *Bcl-2* (homologue humain de *ced-9*). Une catégorie de signaux favorise le déclenchement de la mort : ce sont des molécules de surface qui agissent lors des contacts entre cellules ou qui sont libérées dans le milieu et se fixent sur les récepteurs de surface des cellules cibles. Les membres les plus étudiés de cette famille sont deux molécules

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

exprimées notamment par les cellules du système immunitaire : le facteur nécrosant des tumeurs (TNF) et le ligand du récepteur Fas. Ainsi la survie ou la mort d'une cellule dépend non seulement de la nature des signaux qu'elle reçoit à un moment donné, mais aussi de ceux qu'elle a reçus auparavant. Pourtant, exception à cette règle, le système immunitaire peut obliger une cellule à s'autodétruire indépendamment de la nature des signaux qu'elle a reçus de son environnement et des gènes de survie qu'elle exprime. Lorsque des agents infectieux, comme les virus, certaines bactéries et de nombreux parasites sont capables de se multiplier à l'intérieur des cellules de l'organisme, le système immunitaire les détruit en forçant les cellules infectées au suicide. Dans ce cas, les lymphocytes tueurs libèrent au contact des cellules qu'ils reconnaissent comme anormales ou infectées des protéines granzymes et perforines qui pénètrent dans la cellule ciblée. Les granzymes activent directement en les coupant les précurseurs inactifs des caspases (les exécuteurs du suicide) de la cellule anormale. Les mécanismes moléculaires qui déterminent la décision de survie ou de mort des cellules de mammifères se sont révélés beaucoup plus complexes que ne le laissent soupçonner les résultats obtenus par l'étude de *C. elegans*.

La famille des caspases humaines (homologues de *ced-3*), qui déclenchent la machinerie d'autodestruction, compte au moins dix membres. Un même degré de complexité est apparu dans les homologues humains du gène *ced-9*. Aujourd'hui on en connaît dix membres qui composent la famille Bcl-2 avec ses deux sous-familles antagonistes : une sous-famille comprenant Bcl-2 et Bcl-x qui favorisent la survie et l'autre sous-famille comprenant Bax et Bad qui déclenchent le suicide. Un homologue humain du gène *ced-4*, *apaf-1* vient d'être découvert au courant de l'année 1997. Ainsi le contrôle du suicide des cellules se révèle aussi complexe que celui de leur différenciation et de leur multiplication. En 1990, J.C. Ameisen, propose que les maladies caractérisées par la



## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

disparition de certaines populations cellulaires, dont le SIDA, pourraient résulter d'anomalies du fonctionnement des programmes du suicide cellulaire.

### **A- XII- 4- 5- L'apoptose pathologique et expérimentale**

Biava et Mukhlova-Montiel étaient parmi les premiers à suggérer l'utilisation du microscope électronique pour distinguer les Councilman bodies dans les cellules du foie humain [35]. Il est à noter qu'en dehors de l'intérêt récent, l'apoptose n'a pas été sujet à une analyse systématique dans les maladies du foie. Dans les conditions expérimentales, plus de résultats sont disponibles particulièrement pour l'action apoptotique de plusieurs drogues et agents toxiques. L'exemple le plus ancien de l'apoptose hépatocytaire est observé dans la maladie du foie due au virus de la fièvre jaune [192]. Il est aussi connu que des virus qui induisent des maladies hépatiques peuvent causer à la fois apoptose et nécrose [105,192]. L'évolution du cancer est le résultat d'un déséquilibre entre les mitoses cellulaires anormales et l'apoptose, avec le premier qui devient plus important que le deuxième. Une conséquence importante en oncologie est de promouvoir l'apoptose par chimiothérapie ou par des drogues anticancéreuses pour limiter la prolifération cellulaire [472]. L'apoptose a été aussi étudiée *in vitro* dans des hépatocytes en culture primaire et dans des lignées cellulaires d'hépatomes pour obtenir des informations concernant le mécanisme de la mort cellulaire programmée. Il a été noté que certains cancérigènes, comme le phénobarbital, peuvent supprimer l'apoptose et par conséquent favoriser le développement de la tumeur [54]. Plusieurs agents toxiques sont connus pour causer l'apoptose hépatique, comme l'alcool chez le rat et la souris [18,151]. D'autres exemples de drogues peuvent induire l'apoptose des hépatocytes comme le dimethylnitrosamine [393,405], thiocetamide [253], cocaïne [66], cycloheximide [120,254]. Il est important de noter que ces agents toxiques sont souvent accompagnés par les deux formes de mort

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

---

cellulaire, la nécrose et l'apoptose [253]. L'apoptose a été aussi décrite dans le foie après administration du  $\text{CCl}_4$  [53], galactosamine [306], alfatoxine [44], cuivre [222]. Dans les cultures d'hépatocytes, il faut noter que l'apoptose peut se produire spontanément et que la mort cellulaire programmée semble dépendre de la densité cellulaire [278]. L'utilisation des cultures primaires d'hépatocytes permet de comprendre le mécanisme de l'apoptose. Patel *et al.*, [374] ont bien montré que le sel biliaire glycodeoxycholate peut induire l'apoptose des hépatocytes de rat en augmentant la concentration du  $\text{Mg}^{2+}$  et en stimulant l'endonucléase- $\text{Mg}^{2+}$ . D'autres auteurs [404,462] ont analysé les différents facteurs qui agissent dans l'induction de l'apoptose des hépatocytes de souris en culture par l'acétaminophène. Dans ce système, ils ont montré que l'acide tricarboxylique, un inhibiteur de l'endonucléase- $\text{Ca}^{2+}$ , et l'EGTA, un chélateur du  $\text{Ca}^{2+}$ , réduisent la fragmentation de l'ADN. Dans ce contexte d'études sur le mécanisme de l'apoptose, les lignées cellulaires d'hépatomes humains peuvent être utilisées [337]. L'apoptose peut être induite *in vitro* et *in vivo* par plusieurs composés naturels comme le  $\text{TGF}\beta 1$  qui est connu pour inhiber la synthèse d'ADN et donc considéré antiprolifératif. Son rôle inducteur de l'apoptose a été analysé *in vitro* sur des hépatocytes en culture primaire et sur des lignées d'hépatomes [268,354]. L'activin qui fait partie de la superfamille des TGF induit, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, une perte significative des hépatocytes par apoptose [188,455].  $\text{TNF}\alpha$  induit *in vivo* [257,258] et *in vitro* [257,463] l'apoptose des hépatocytes. Son action *in vitro* semble potentialisée par l'interféron gamma [463].

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

### **B- BASES MOLÉCULAIRES ET CELLULAIRES DES ADDICTIONS**

La dépendance résulte des adaptations des neurones centraux spécifiques suite à la répétition de l'exposition à une drogue d'addiction. Ces adaptations se combinent pour former un comportement complexe qui définit l'état de dépendance. Les études progressent pour identifier ces adaptations temporelles, les adaptations induites par les substances d'addiction et pour les relier à un aspect comportemental particulier de l'addiction.

Les recherches actuelles ont besoin de comprendre les types d'adaptations qui sont particulièrement à la base des aspects vécus à long terme telle la compulsion et la rechute, et d'identifier les gènes spécifiques qui contribuent aux différences de vulnérabilité des individus vis-à-vis des drogues.

La compréhension des bases cellulaires et moléculaires des états de dépendance va permettre de revoir notre point de vue sur les addictions et enfin pour mieux les traiter.

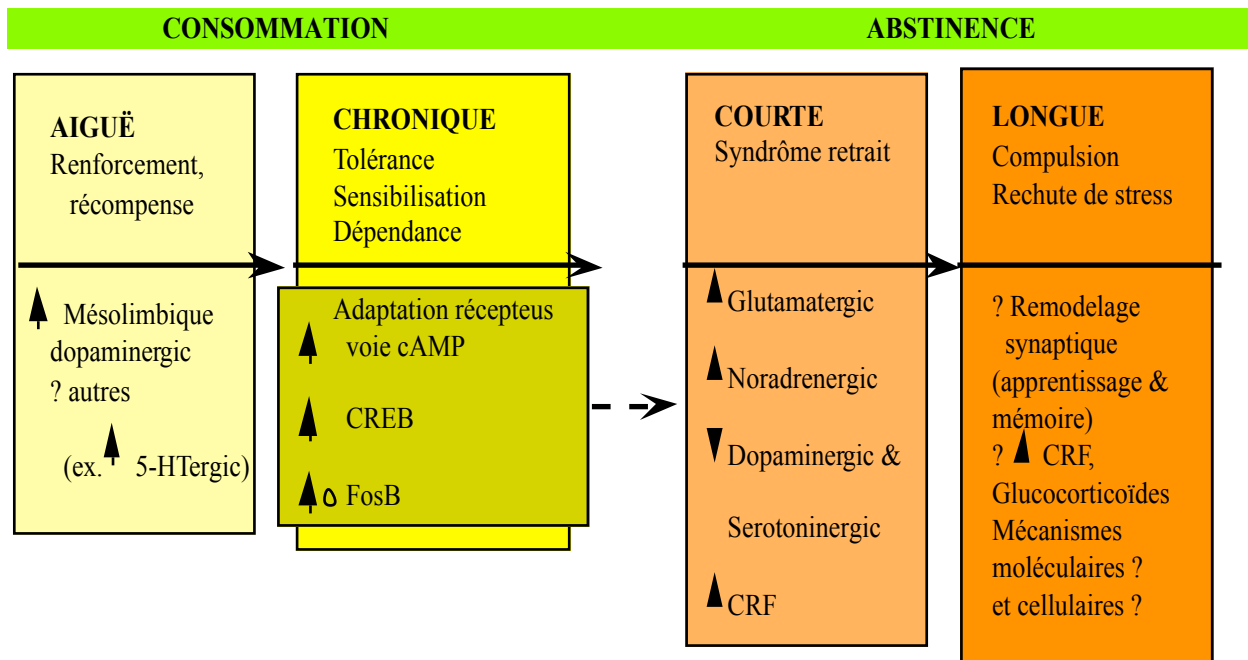
## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

La dépendance est un phénomène complexe avec des causes psychologiques et sociales et des conséquences très importantes. Cependant, à sa base, la dépendance implique des processus biologiques c'est-à-dire les effets de l'exposition répétée à un agent biologique (drogue) sur un substratum biologique (le cerveau) au cours du temps. Le stade ultime est l'adaptation de neurones individuels à l'action de la drogue qui les a activés, puis à leur tour ces neurones vont modifier le fonctionnement de tout le circuit neuronal où elles opèrent. Ceci entraîne éventuellement un comportement complexe où prennent part la dépendance, la tolérance, la sensibilisation et la compulsion [232,234,244,550]. Un challenge crucial pour la compréhension des bases biologiques des addictions serait de connaître l'ensemble des processus temporeux impliqués (Fig. 3). Ainsi, l'évènement initial qui mène vers l'état de dépendance implique une action aiguë de la drogue sur la protéine ciblée et par conséquent son action sur les neurones qui expriment cette protéine. Ces actions sont actuellement assez bien reconnues [232,234,244,550] et ne seront exposées, ici, que les adaptations cellulaires et moléculaires qui se produisent graduellement dans les neurones spécifiques en réponse aux actions chroniques, particulièrement celles qui ont un lien avec les modifications comportementales associées aux dépendances.

L'exemple des opioïdes et de la cocaïne sera développé non seulement parce que ces drogues sont les plus illicites et entraînent le plus de dépendance, mais aussi parce que les adaptations qu'elles produisent sous leurs actions chroniques sont assez bien élucidées. Les adaptations vécues, relativement à court terme et les traits de l'addiction, relativement de courte durée, par exemple le syndrome de retrait somatique et motivationnel et les modifications de sensibilité à la drogue, sont de plus en plus bien établis. Au contraire, le besoin majeur des études futures est d'identifier et de caractériser les adaptations vécues à long terme qui couvrent les aspects de l'addiction, comme la compulsion et la rechute, qui peuvent persister durant toute une vie.

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE



Minutres à heures
Jours à années
Heures à jours
Jours à années

Figure 3. Schéma illustrant le cycle de vie de l'addiction : effet complexe et temps dépendant de

l'exposition à une drogue. Les cases en haut illustrent les processus prééminents associés à chaque stade de l'action des drogues [232,234,244,550]. Les cases en bas montrent les processus moléculaires et cellulaires impliqués (les flèches indiquent le sens de l'évolution). La flèche discontinue indique que les modifications dans les neurotransmissions associées à l'abstinence de court terme (syndrome de retrait) sont supposées être le résultat des adaptations moléculaires et cellulaires aux actions chroniques de la drogue (addiction).

### B- I- UP-RÉGULATION DE LA VOIE DE L'AMPc

L'adaptation moléculaire à l'exposition chronique la plus établie est l'up régulation de la voie de l'adénosine 3',5'-monophosphate (AMPc), un phénomène découvert en premier dans des cellules hybrides (neuroblastome x gliome) et démontré plus tard dans les neurones [341] en réponse à l'administration répétée d'opioïde [77,461]. L'exposition aiguë aux opioïdes inhibe la voie de l'AMPc dans différents types de neurones dans le cerveau [72], alors que l'administration

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

chronique des opioïdes induit une up régulation compensatrice de la voie de l'AMPC dans certains de ces neurones. L'up régulation de la voie de l'AMPC s'opposerait à l'inhibition de cette voie induite par l'administration aiguë des opioïdes et par conséquent représente une forme de tolérance physiologique : après le retrait des opioïdes, l'up régulation de la voie de l'AMPC permettrait une reprise totale de sa fonctionnalité et contribue aux traits de la dépendance et du syndrome de retrait [77,341,461].

Actuellement, des évidences directes ont été obtenues qui supportent ce modèle dans les neurones du locus cœruleus ou LC, le noyau noradrenergique majeur du cerveau. Ces neurones régulent normalement l'attention et les activités du système nerveux autonome et ont été impliqués dans le syndrome de retrait des opioïdes [6]. L'up régulation de la voie de l'AMPC dans le LC [226,283,341,342,398] (Fig. 4) serait responsable de l'augmentation de l'activité neuronale intrinsèque du neurone via l'activation non sélective d'un canal cationique [9,10].

Cette augmentation de l'activité neuronale a été reliée à certains comportements spécifiques lors d'un syndrome de retrait des opioïdes [6,226,235,280,283,342,398]. L'augmentation de l'activité du LC au cours d'un syndrome de retrait est aussi causée par une augmentation de l'activité glutamatergique des neurones [7,402]. Ceci pourrait se faire, en partie, via l'up régulation de la voie de l'AMPC des neurones sensoriels primaires [90,499], qui contribueraient à l'activation de voies ascendantes excitatrices vers le LC.

Même si le débat sur l'importance de la contribution du LC aux traits généraux du syndrome de retrait des opioïdes demeure [73], son homogénéité cellulaire et neurochimique en fait un système modèle utile pour identifier précisément les mécanismes moléculaires et cellulaires à la base des adaptations neuronales à l'exposition chronique aux drogues.

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

Les opioïdes inhibent fortement les neurones du LC par augmentation de la conductance des canaux entrant rectificateurs K<sup>+</sup> couplés aux protéines Gi/o et par abaissement des courants entrant Na<sup>+</sup> dépendants couplés aux protéines Gi/o. Ceci inhibe l'adénylate cyclase (AC) et baisse les concentrations d'AMPc et réduit l'activité des kinases AMPc dépendantes PKA, la phosphorylation des canaux et pompes et nombreuses autres protéines et affecte d'autres processus dans le neurone. Par exemple, la phosphorylation de CREB baisse et peut initier des modifications à long terme dans la fonction des neurones du LC. Les flèches bleues résumant l'effet de l'administration chronique de la morphine dans le LC. La morphine chronique augmente la concentration des types I et VIII de l'AC, la sous-unité catalytique (C) et régulatrice (RII) de la PKA et d'autres phosphoprotéines incluant CREB. Ces changements contribuent aux altérations associées au phénotype de l'état dépendant. Par exemple, l'excitabilité intrinsèque des neurones du LC est augmentée par l'augmentation de l'activité de la voie AMPc et des courants entrants Na<sup>+</sup> dépendants qui contribuent à la tolérance, la dépendance et le syndrome de retrait que montrent ces neurones. L'up régulation du type VIII de l'AC est lié à CREB alors que celles du type I de l'AC et des sous-unités de la PKA seraient CREB indépendantes et liées à un mécanisme inconnu.

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

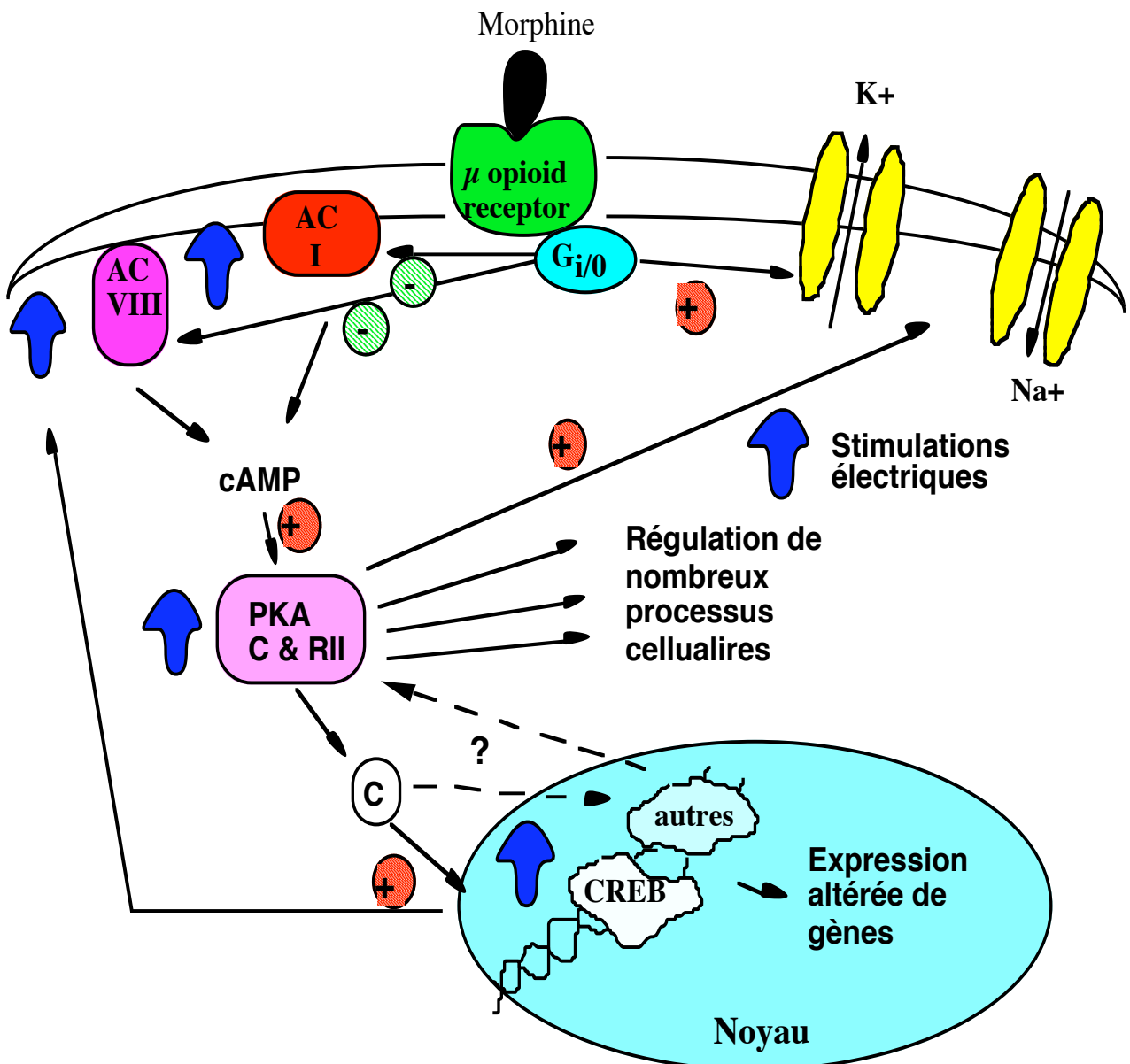


Figure 4. Schéma illustrant l'action des opioïdes dans le locus cœruleus.

La connaissance précise des étapes moléculaires par lesquelles l'up régulation de la voie de l'AMPc se produit est connue (Fig. 4). L'administration chronique des opioïdes up régule sélectivement les deux formes de l'adenylate cyclase (type I et VIII) dans ces neurones [249,298]. L'up régulation du type VIII semble via l'APMc responsive element binding protein (CREB), une protéine dont la régulation dans le cerveau est majoritairement dépendante de l'AMPc. Une réduction des concentrations de CREB, obtenue par une infusion d'oligodésoxynucléotides (ODNs) anti CREB directement dans cette région, bloque l'induction de cette enzyme induite par



## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

l'administration de la morphine [249]. Au contraire, l'up régulation du type I de l'AC et des sous-unités de la PKA n'est pas altérée par ce traitement, ce qui laisse supposer que leur régulation se ferait via des mécanismes distincts. En accord avec ces résultats, le traitement par les ODNs de CREB atténue partiellement l'activation des neurones du LC durant le retrait ainsi que la sévérité de certains comportements spécifiques au retrait des opioïdes [249]. Ces observations dans le LC sont consistantes avec l'observation générale que des souris mutantes déficientes en CREB, une déficience ubiquitaire, montrent une atténuation du syndrome de retrait des opioïdes [281].

L'up régulation de la voie AMPc se produit également dans les neurones du noyau accumbens ou NA en réponse à l'administration chronique d'opioïdes, de cocaïne ou d'alcool [370,450,521]. Cependant, il reste à savoir lequel type de neurones dans cette région exprime cette adaptation. Le NA, une cible du système mésolimbique dopaminergique, joue un rôle dans l'état motivationnel et est impliqué dans l'action de renforcement de la majorité des substances d'addiction [234,235,244,550]. Parce que les récepteurs de la dopamine D<sub>1</sub> agissent via les protéines excitatrices hétérotrimériques liant le GTP ou protéines Gs et activent la voie AMPc, l'up régulation de cette voie dans le NA pourrait contribuer à l'hypersensibilité des récepteurs D<sub>1</sub> observée dans ces neurones, qui se produit sans aucun changement détectable dans les récepteurs eux-mêmes, après exposition chronique à la cocaïne ou autres stimulants [169]. Des évidences montrent que l'up régulation de la voie de l'AMPc peut produire cet effet via la phosphorylation par la PKA de canaux Na<sup>+</sup> voltage dépendants [541].

Des études récentes ont fait un lien direct entre l'up régulation de la voie AMPc dans le NA et les aspects comportementaux de l'action de drogues. Une hypothèse propose que l'up régulation de la voie AMPc s'oppose aux mécanismes de renforcement des drogues et des substances de renforcement naturelles et contribue à un effet motivationnel négatif ou aversif durant le retrait [458,527]. Une hypothèse contraire est également proposée [207]. Il existe aussi des évidences que

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

l'up régulation de la voie de l'AMPC peut simultanément contribuer à la sensibilisation de l'activation motrice des stimulants [96,314].

Le mécanisme par lequel l'exposition chronique aux drogues induit l'up régulation de la voie de l'AMPC dans le NA n'est pas encore clair. L'administration chronique d'opioïdes et autres stimulants altère la phosphorylation de CREB [76,517] ou son expression [543] dans cette région et d'autres régions du striatum. Étant donné que les gènes des peptides opioïdes contiennent le site CRE (AMPC responsive element) de l'action de CREB sur l'ADN et que l'administration chronique de drogues régule CREB, les peptides opioïdes sont des cibles potentielles de l'action de CREB dans ces régions [189,480]. Cependant, ces adaptations moléculaires n'ont pas encore été liées directement aux comportements régulés par les drogues. En accord avec son implication dans l'addiction, CREB a aussi été impliquée dans la médiation de formes à long terme de plasticité neuronale et comportementale [45,60,103,236,557].

Des évidences préliminaires ont également impliqué la voie de l'AMPC dans d'autres régions cérébrales, incluant l'aire ventrale tégmentale ou VTA, le noyau des corps des cellules du système mésolimbique dopaminergique impliqué dans le renforcement des drogues [41,505] et l'aire periaqueducatale grise ou PAG, une région qui contient un noyau sérotoninergique impliqué dans le syndrome de retrait des opioïdes [199,283,398]. Des évidences biochimiques et électrophysiologiques suggèrent que l'exposition chronique aux opioïdes up régule la voie de l'AMPC dans ces régions cérébrales, spécifiquement dans des neurones GABAergiques (contenant l'acide  $\gamma$ -amino-butérique) innervant les cellules dopaminergiques et sérotoninergiques [41,199,505]. En accord avec ce modèle, l'up régulation de la voie de l'AMPC peut stimuler la libération du GABA durant le retrait et inhiber l'activité des neurones dopaminergiques et sérotoninergiques. L'inhibition des premiers est supposée responsable de la réduction de la neurotransmission dopaminergique du VTA au NA, qui se produit lors des phases précoces du

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

retrait des drogues, et de l'aversion associée au retrait [234,245]. L'inhibition des seconds est supposée contribuer aux aspects somatiques et motivationnels du retrait via l'inhibition de l'innervation diffuse par la sérotonine de l'ensemble de l'axe neural [198,199,232,234,244,550].

Les travaux réalisés sur ces régions cérébrales discrètes suggèrent l'hypothèse que l'up régulation de la voie de l'AMPC pourrait se produire également dans d'autres régions cérébrales suite à l'administration chronique d'opioïdes ou autres drogues. Par exemple, l'up régulation peut se produire dans certains types de cellules spécifiques du cortex et de l'hippocampe. Ces régions cérébrales jouent un rôle critique dans les aspects à long terme, particulièrement cognitifs, de l'addiction (voir plus loin). De telles adaptations n'ont pas encore été détectées dans ces régions par les méthodes biochimiques probablement à cause de leur grande hétérogénéité cellulaire.

### **B- II- ADAPTATIONS DANS LE COUPLAGE RÉCEPTEUR-PROTÉINES G**

Les récepteurs opioïdes et dopaminergiques, qui appartiennent à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G, sont des médiateurs critiques des effets aigus de renforcement des opioïdes et de la cocaïne [232,234,244,550]. Ces récepteurs et autres récepteurs couplés aux protéines G subissent des processus complexes de désensibilisation et de down régulation après une exposition courte à leurs agonistes. Une question importante n'a pas encore reçu de réponse, c'est de savoir si les adaptations dans ces processus contribuent ou non aux modifications à long terme de la sensibilité des récepteurs, comme la tolérance ou la sensibilisation, qui se produisent lors des expositions répétées aux drogues d'addiction (Fig. 5). Le challenge serait de montrer que ces adaptations sont à la base de la plasticité comportementale lors de l'exposition aux drogues.

Un mécanisme hypothétique de la désensibilisation à court terme des récepteurs opioïdes et D2 serait leur phosphorylation. Ce modèle prédit que ces récepteurs fonctionnent comme les

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

---

récepteurs  $\beta$  adrénergiques dont la phosphorylation par différentes kinases peut induire leur internalisation et peut-être même réduit l'efficacité de leur couplage aux protéines G [130]. Un tel mécanisme implique les kinases des récepteurs couplés aux protéines G (GRKs). Ces dernières phosphorylent uniquement la forme du récepteur lié à l'agoniste et les protéines associées, nommées arrestines qui lient et séquestrent le récepteur phosphorylé. Les récepteurs opioïdes et dopaminergiques sont phosphorylés par les GRKs et d'autres kinases. Dans certaines études, la phosphorylation aboutit à une désensibilisation des récepteurs [12,240,376,560,562]. De façon similaire, les récepteurs opioïdes subissent une internalisation suite à l'application aigüe *in vitro* ou *in vivo* de l'agoniste [372,485].

Cependant, l'altération de ces mécanismes de phosphorylation et internalisation des récepteurs sous l'administration chronique des drogues n'est pas claire. Une étude a montré une up-régulation des concentrations de certaines GRKs et d'arrestines dans des régions spécifiques du cerveau après administration chronique d'opioïdes [500].

Un autre mécanisme hypothétique pour l'adaptation fonctionnelle des récepteurs opioïdes et dopaminergiques à l'administration chronique de drogues implique l'altération du couplage entre les récepteurs et les protéines G [469,497,540]. Ceci peut résulter d'adaptations dans les mécanismes de la phosphorylation des récepteurs ou alternativement, dans l'abondance des sous-unités des protéines G ou des nombreuses autres protéines capables de modifier la fonction des protéines G. De plus, l'exposition chronique à la cocaïne ou à la morphine baisse l'expression des sous-unités  $\alpha_i/o$  des protéines G, responsables du mécanisme initial de couplage des récepteurs opioïdes aux récepteurs  $D_2$ -like dopaminergiques dans des régions cérébrales spécifiques [14,484,491,499]. Des adaptations ont également été démontrées pour d'autres types de sous-unités  $\alpha$  des protéines G [528,533]. Il serait donc intéressant de savoir si l'exposition chronique aux drogues modifie le couplage des récepteurs aux protéines G via des régulations de l'expression

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

d'autres protéines capables de modifier la fonction des sous-unités  $\alpha$  des protéines G. Celles-ci incluent les sous-unités  $\beta\gamma$  des protéines G [97], la phosducine qui régule la liaison des sous-unités  $\gamma\beta$  à leur sous-unité  $\alpha$  ou encore les protéines RGS (régulatrices de la signalisation des protéines G). Ces dernières affectent l'activité GTPasique intrinsèque des sous-unités  $\alpha$  [108]. La découverte de plusieurs formes de RGS (18 isoformes) capables de réguler la fonction des sous-unités G $\alpha$ i/o suivant un paterne d'expression spécifique dans le cerveau en fait des cibles attractives dans les mécanismes d'adaptation aux drogues [108,150]. De plus, la tolérance ou la sensibilisation peut être le résultat d'altérations des canaux ioniques [239], par exemple les canaux ioniques K<sup>+</sup> (G protein-gated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels) et les canaux Ca<sup>2+</sup> présynaptiques, qui sont des médiateurs d'effets aigus des récepteurs opioïdes et dopaminergiques.

### **B- III- ADAPTATIONS CELLULAIRES ET MOLÉCULAIRES DE LONGUE DURÉE**

Dans l'ensemble les adaptations moléculaires et cellulaires à l'administration répétée de drogues persistent seulement pendant de courtes durées après la cessation de l'administration des drogues par opposition à certaines conséquences de cette exposition qui elles sont de longue durée aussi bien chez l'homme que chez l'animal. Le but des recherches actuelles est de clarifier les bases moléculaires et cellulaires de ces adaptations de longue durée. Une possibilité, par analogie aux modèles de la mémoire à long terme [45,60,103,236,557], est que ces adaptations de long terme impliquent des changements relativement stables de l'expression des gènes, qui induisent des changements dans la neurotransmission et peut-être dans la structure et le nombre de synapses formées par un seul neurone. Les facteurs de transcription représentent clairement un mécanisme potentiel de la persistance de la plasticité induite par les drogues. Le rôle de CREB a déjà été discuté et celui des facteurs de la famille Jun et Fos est également très étudié dans le contexte des

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

---

addictions. Plusieurs facteurs sont rapidement, mais transitoirement, induits dans le NA et le striatum par l'administration aiguë de stimulants, d'opioïdes ou de nicotine. Au contraire, l'administration chronique de drogues désensibilise l'induction de ces protéines et résulte dans l'accumulation graduelle de nouvelles Fos-like protéines appelées chronique FRAs ou Fos-related antigen [186,323,347,385]. Ces FRAs ont été identifiées comme des isoformes de  $\Delta$ Fos, une forme tronquée du produit du gène *FosB* [70,179,289]. Par leur stabilité extraordinaire, les isoformes  $\Delta$ FosB s'accumulent dans le cerveau au cours des administrations répétées de drogues [70] et pourraient être les candidats médiateurs des commutations ou "switches" moléculaires à la base des adaptations aux effets à long terme des drogues. Même si les gènes cibles des isoformes  $\Delta$ fosB sont encore inconnus, l'importance de ces formes dans la médiation de la plasticité comportementale aux drogues d'addiction a été montrée : la lignée de souris FosB/KO est plus sensible aux effets moteurs et de renforcement de la cocaïne [179]. Ces résultats sont en faveur de l'hypothèse selon laquelle l'induction de ces protéines représente une adaptation compensatrice qui s'oppose aux effets aigus des drogues. Les adaptations dans la transmission glutamatergique représentent un médiateur potentiel des effets à long terme des drogues, en vertu de son rôle général dans la modulation de la plasticité neuronale [269].

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

---

L'induction d'adaptations dans l'efficacité de couplage des récepteurs avec les protéines Gi/o peut contribuer aux aspects de tolérance et de sensibilisation. Un mécanisme possible serait l'adaptation dans les processus médiateurs de la désensibilisation aiguë de la fonction du récepteur, par exemple par phosphorylation par les GRKs (1). Les autres mécanismes possibles incluent l'altération des concentrations des sous-unités  $\alpha$  (2) ou  $\beta\gamma$  (3) des protéines G ou autres protéines, comme la phosducine (4) ou RGS (5), qui modulent la fonction des protéines G. La phosphorylation du récepteur, par la PKA, ne participe pas à sa désensibilisation aiguë car l'activation du récepteur inhibe la PKA. Cependant, l'up régulation de la kinase [6,235,280] après une administration chronique des drogues (voir Fig. 4) peut phosphoryler, et par conséquent réguler la fonction du récepteur pendant le retrait. L'internalisation du récepteur phosphorylé est également montrée.

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

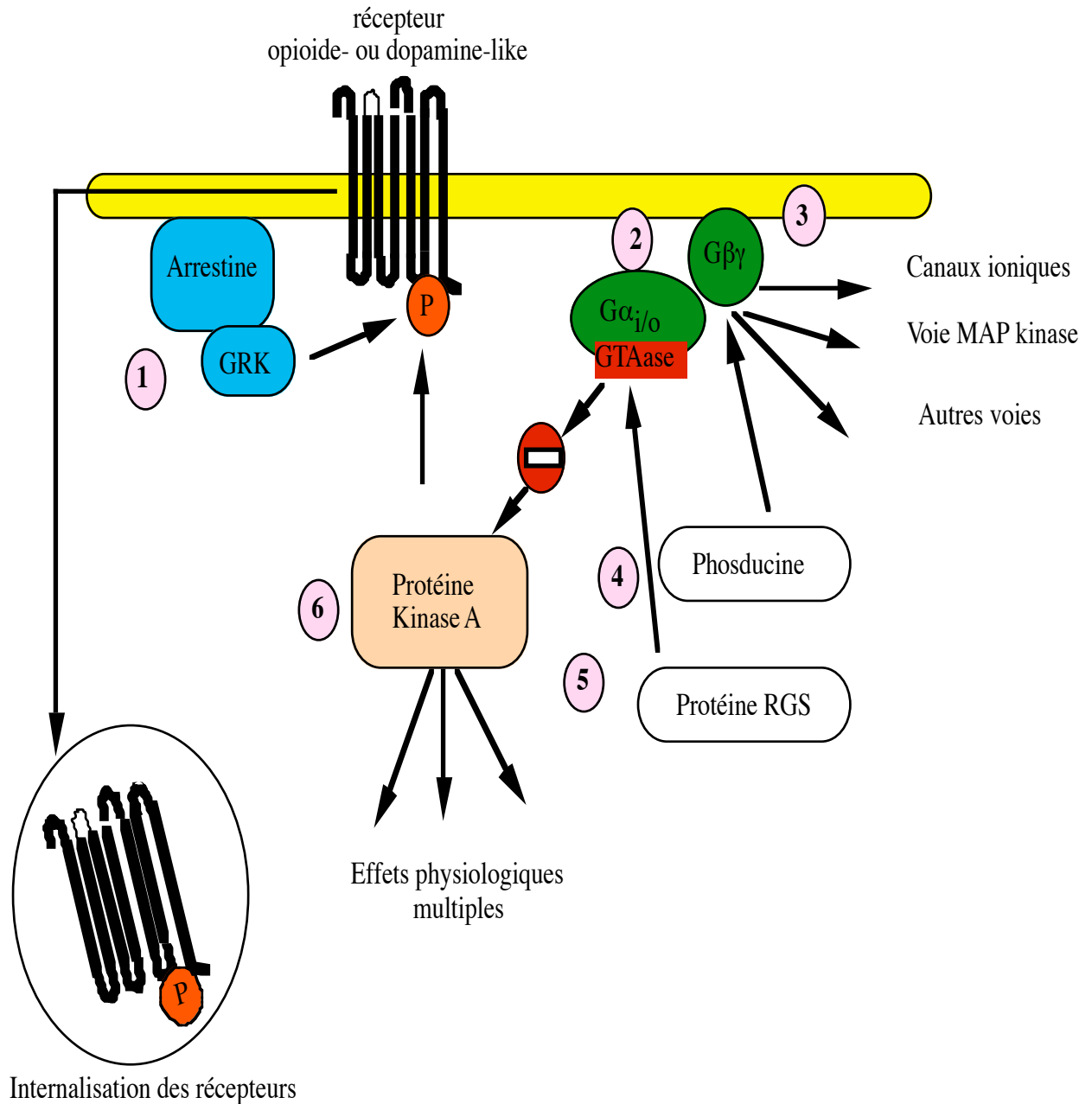


Figure 5. Schéma illustrant les mécanismes possibles de modifications induites par les drogues sur la sensibilité des récepteurs opioïdes ou dopamine-D2.

Les neurones dopaminergiques de la VTA montrent une augmentation de sensibilité à la stimulation, par l'acide  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique (AMPA), des récepteurs au glutamate après exposition chronique aux stimulants [542,563]. Ceci pourrait être le résultat d'une sur-expression de sous-unités spécifiques des récepteurs AMPA dans ces neurones en



## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

réponse à l'administration chronique d'opioïdes, de cocaïne ou d'alcool. Cette adaptation pourrait contribuer à l'élévation de l'activité du système dopaminergique mésolimbique, un mécanisme proposé dans la sensibilité aux drogues [195,200,232,234,244,245,427,550]. Cette possibilité a été confortée directement par le fait que la sur-expression de certaines sous-unités des récepteurs AMPA dans les neurones VTA uniquement, par l'utilisation des techniques de transfert des gènes par les virus, sensibilise les animaux aux effets moteurs et de renforcement de la morphine [61]. Les neurones du NA montrent également des altérations de leur sensibilité au glutamate et de l'expression de sous-unités spécifiques des récepteurs au glutamate [275,542,563].

Le rôle de la transmission glutamatergique dans les addictions a également été renforcé par plusieurs études qui ont montré que la co-administration des antagonistes des récepteurs au glutamate, particulièrement de type *N-methyl-D-aspartate* (NMDA), atténue le développement de la tolérance aux effets analgésiques des opioïdes et la sensibilité aux effets moteurs de plusieurs drogues d'addiction [116,195,200,427,511]. L'inhibition pharmacologique ou par les ODNs antisens de l'enzyme de synthèse du monoxyde d'azote (NO) NOS, produit des effets similaires [227,228,530]. Cette enzyme génère un signal NO en réponse à l'activation des récepteurs NMDA, lequel NO est proposé un médiateur de certains effets du récepteur. Cependant, les interactions entre les antagonistes des récepteurs NMDA et les drogues d'addiction sont plus complexes que la simple inhibition des derniers par les premiers. Comme pour les opioïdes, la cocaïne et les drogues d'addiction, les antagonistes NMDA, comme la phencyclidine (PCP) et le MK-801, ont des effets stimulants et de renforcement propre, et peuvent potentialiser les effets activateurs et de renforcement des drogues d'addiction [62]. Ces observations suggèrent que la co-administration chronique des antagonistes NMDA augmente l'addiction à certaines drogues, en dehors de ses effets sur la tolérance analgésique et la sensibilisation motrice. Clairement, des efforts plus

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

importants devraient être réalisés pour caractériser les bases moléculaires et cellulaires des interactions complexes entre ces substances.

Il est concevable que les aspects à long terme des addictions pourraient faire intervenir des facteurs neurotrophiques, en premier étudiés uniquement pour leurs rôles dans la croissance et la différenciation des neurones au cours de leur développement et actuellement, sont connus pour leurs rôles très importants dans la survie, le maintien et la transduction du signal des neurones adultes. L'infusion de facteurs neurotrophiques directement dans des régions cérébrales spécifiques prévient et renverse des adaptations moléculaires aux effets de l'administration chronique des opioïdes ou de la cocaïne [30,471]. De plus, l'administration chronique de drogues altère les concentrations de protéines spécifiques de la cascade de signalisation des facteurs neurotrophiques [28,29]. La recherche des adaptations durables associées aux addictions devrait tenir compte du fait que ces adaptations pourraient se produire dans d'autres régions cérébrales en dehors du système dopaminergique mésolimbique. L'implication d'autres régions cérébrales, comme le cortex, l'hippocampe et des structures limbiques, comme l'amygdala et le septum, est logique du fait de la complexité des composantes cognitive, affective et motivationnelle de l'addiction. D'autre part, peu de choses sont connues sur l'effet chronique des drogues sur la physiologie et la biochimie des neurones dans ces régions cérébrales. Un besoin immense de modèles animal demeure pour évaluer, non les effets aigus de renforcement des drogues mais, l'implication de ces régions cérébrales dans les aspects complexes des addictions.

### **B- IV- POUR LE FUTUR.**

La compréhension de la biologie des addictions nécessite la connaissance du processus des transformations d'effets aigus des drogues d'addiction en adaptations progressives et de long terme dans des régions spécifiques du cerveau (Fig. 3). L'identification de ces adaptations de long terme

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

est plus compliquée et c'est là où notre savoir présente une immense faille qu'il faudrait combler. Alors que les modèles moléculaires et cellulaires de la dépendance, de la sensibilisation, de la tolérance et du retrait ont été développés, peu de choses sont connues sur les formes à long terme de la sensibilisation, de la compulsion et de la rechute observées après des mois voir même des années d'abstinence. De ce point de vue, le challenge dans le domaine des addictions est analogue de celui d'autres domaines où l'adaptation des fonctions nobles du cerveau est impliquée. Par exemple, bien que des modèles cellulaires et moléculaires de la mémoire existent, notre compréhension des mécanismes spécifiques de la mémoire du comportement reste rudimentaire.

Donner simplement une drogue à un animal, ou même lui permettre de s'auto administrer cette drogue, ne capture pas l'image complète d'un état d'addiction [232,234,244,550]. Le modèle animal de rechute, dans lequel le comportement toxicomane peut être stimulé, même après des périodes relativement longues d'abstinence, par exposition à la drogue ou par la présentation du stimulus conditionnel (associé à l'environnement) de l'exposition à la drogue ou peut-être encore de façon plus forte par l'exposition à certaines formes de stress [383,457,459,460], représente une approche prometteuse pour les recherches futures. L'induction par le stress des rechutes, particulièrement vraie pour les addictions chez l'homme, pourrait être via n'importe quel système neuronal ou hormonal sensible au stress. Des attentions particulières ont été portées à l'axe hypothalamus-hypophyse-glandes surrénales avec le CRF (corticotropin-releasing factor) et les glucocorticoïdes [234,383,457,459,460]. Le rôle des monoamines, des peptides opioïdes et des cytokines, pour ne citer que certains, est un domaine pour des investigations futures intenses mais, chaque fois que des connaissances sont acquises à l'échelle d'un système, l'identification précise des adaptations moléculaires et cellulaires dans les neurones spécifiquement responsables de l'induction de la rechute liée au stress ou autres formes de rechutes devient possible.

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

L'étude des gènes cibles par les méthodes très puissantes de la biologie moléculaire (expression et délétion de gènes) permet d'établir un lien de causalité entre les aspects moléculaires et comportementaux des addictions [110,148,179,276,281,282,479,520,554]. Plusieurs de ces études ont bien établi le rôle joué par des protéines particulières, comme les récepteurs des opioïdes, de la dopamine et le transporteur de la dopamine, dans l'action centrale aiguë des drogues d'addiction. Dans une récente étude, la délétion du gène codant le récepteur D<sub>2</sub> de la dopamine génère une lignée insensible à l'effet de renforcement des opioïdes, mais développe toujours une dépendance physique aux opioïdes [282]. Ce résultat est en accord avec les conclusions initialement atteintes par d'autres sur l'importance du système dopaminergique dans l'effet de renforcement des opioïdes et l'implication en premier lieu de mécanismes non dopaminergiques dans la dépendance physique [6,232,235,244,280,550]. En plus de l'absence de réponses à l'action aiguë de la drogue, certaines des souris mutantes ont montré des adaptations neuronales et comportementales, et par conséquent pourraient peut-être représenter des modèles des voies que le cerveau utilise pour compenser les adaptations induites par les drogues. Plus encore, certaines études ont mis en évidence le rôle du produit de certains gènes, qui à priori n'étaient pas impliqués, comme les facteurs de croissance, dans l'action aiguë des drogues dans le processus d'addiction. La possibilité de relier l'altération de protéines spécifiques aux mécanismes d'addiction sera facilitée par l'utilisation des méthodologies actuelles, comme la transgénèse [70,301,515], la délétion et les vecteurs viraux [61,201,336] qui visent la modification de l'expression d'un gène spécifique dans une population particulière de neurones et à différents stades de la vie d'un animal.

L'altération du cerveau par les drogues d'addiction dépend en partie de facteurs génétiques : les réponses aiguës aux drogues et les adaptations à leur administration répétée peuvent varier de façon remarquable suivant le génome de l'individu [32,84,371,519]. Les facteurs génétiques peuvent également influencer les réponses du cerveau au stress et contribuent donc certainement à

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

la rechute qu'il induit. Même s'il a été difficile d'identifier des gènes particuliers, qui contribuent aux différences inter individuelles quant à la vulnérabilité aux addictions et au stress chez les animaux de laboratoire et l'humain, ce travail reste très prioritaire parce qu'il nous permettra de comprendre et de mieux soigner les maladies de l'addiction. De plus, les bases génétiques des différences inter individuelles de susceptibilité aux drogues et au stress représentent un modèle puissant de la manière avec laquelle les facteurs environnementaux et génétiques se combinent pour contrôler le fonctionnement cérébral en général. Les connaissances dans ce domaine peuvent avoir un impact général très important en psychiatrie et en neurologie, puisque nous cherchons de comprendre non seulement les causes génétiques et environnementales des comportements anormaux, mais aussi des variations normales des traits du comportement.

Enfin, la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires des addictions transformera notre manière de voir et de traiter ces maladies. Les notions vagues d'addiction, de stress et de rechute seront remplacées par des connaissances spécifiques qui serviront de base pour les nouveaux traitements anti-addictions. Les traitements incluent la réversion des effets délétères de l'exposition aux drogues sur les neurones vulnérables et aussi les traitements qui préviennent l'aptitude des stimuli environnementaux, comme le stress et les stimuli conditionnels, à précipiter la rechute. Il serait un jour possible d'identifier les individus particulièrement vulnérables aux dépendances et aux stress et de les cibler par une aide psychologique spécifique. De cette manière, les dépendances doivent être considérées analogues des autres maladies où les facteurs génétiques, environnementaux et psychologiques nécessitent différents niveaux d'intervention pour le traitement et la prévention.

# **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

## **C- BASES GENETIQUES DES ADDICTIONS**

Les approches génétiques ont été appliquées à l'étude de toutes les substances d'addictions avec plus ou moins d'ardeur. L'étude systématique "moderne" de l'influence des gènes sur la sensibilité aux drogues a débuté vers les années 1940. Mardones [292] a sélectionné génétiquement des rats pour leur forte et faible consommation d'alcool. Cette expérience de base a été reproduite plusieurs fois avec un niveau de sophistication croissant.

Les travaux d'avant les années 1991 sur la contribution des facteurs génétiques à la différence de sensibilité des individus aux effets de l'alcool, des barbituriques, des opiacés, des benzodiazépines, de la cocaïne, des amphétamines, de la nicotine et autres drogues, ont déjà été rapportés [86]. Les stratégies génétiques qui ont été employées pour chaque classe de substance d'addiction ont également été rapportées dans d'autres articles [51,88,92,294,316,474,518] avec un effort particulier sur l'utilisation du modèle génétique animal dans les études pré-cliniques.

Les méthodes génétiques employées dans le cas des populations humaines pour établir l'influence des facteurs génétiques ont aussi été rapportées [93]. Dans cet exposé, nous décrirons brièvement les méthodes génétiques et leur force et faiblesse en se basant sur des données récentes. Les détails sur certaines approches spécifiques devront être consultés directement dans les publications initiales. Cet exposé sera donc dédié à l'influence génétique sur la sensibilité et le comportement toxicomaniaque. Les différences de sensibilité liées à la disponibilité de la cible centrale pour l'action de la substance d'addiction ne sont pas considérées.

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

Alors qu'il existe des études sur l'homme montrant la prédisposition génétique à l'addiction vis-à-vis d'une substance particulière et que le nombre de travaux suggérant des associations de certains gènes avec l'alcoolisme ou d'autres dépendances a augmenté considérablement, cet exposé sera consacré uniquement aux résultats des recherches sur le modèle animal et seulement à certaines classes de drogues pour illustration.

Les drogues produisent des réponses multiples en fonction de la dose et de la chronicité. On note l'utilisation du modèle animal pour l'étude de la sensibilité interindividuelle à certaines réponses comme la sensibilité initiale, la tolérance, la sensibilisation ou réversion de tolérance et la dépendance proprement dite qui peut-être marquée par le syndrome de retrait. Ces réponses peuvent être étudiées par l'approche génétique car elles sont influencées par le génome mais elles ne sont pas complètement sous son contrôle. Les drogues ont un effet renforçateur ou de punition sur le comportement. Les hommes et les animaux s'engagent dans la recherche de la drogue, c'est le comportement toxicomaniaque. La force d'une réponse particulière à une drogue particulière, aussi bien chez l'homme que chez l'animal, dépend du tempérament, de l'état émotionnel et agressif, des néophobies, des attitudes exploratoires, des aspects variés de l'apprentissage et des motivations des individus. Tous ces traits de la personnalité sont influencés par les gènes. Particulièrement pour les prédispositions génétiques chez l'homme, le tempérament et la personnalité compliquent les efforts pour identifier les domaines génétiques et les limites spécifiques pour l'estimation du risque à cause de leur caractère confus.

Parfois, on trouve des sensibilités parallèles à tous les effets d'une substance, par exemple les effets de la nicotine sur la crise et la consommation volontaire par voie orale ont été corrélés dans plusieurs souches de souris [92]. Cependant, le modèle animal montre que généralement, la prédisposition génétique à un effet de la substance ne généralise pas à d'autres effets de la même substance [85] ni même au sein d'un même effet à des doses plus ou moins élevées de la même

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

substance [84]. À cette situation complexe, s'ajoute le fait que les réponses aux drogues sont clairement polygéniques, c'est-à-dire qu'aucun gène seul ne va déterminer la majeure partie d'une susceptibilité à un effet d'une drogue. Les gènes relevants ont une influence modeste, le chercheur doit utiliser des techniques capables de détecter l'influence composite de plusieurs gènes.

### **C- I-            EXISTENCE ET INTERVALLE D'INFLUENCE DE LA GÉNÉTIQUE**

La surveillance des effets des drogues chez des souches obtenues par croisement à l'intérieur d'une espèce ont permis de conclure que les variations entre souches sont liées à l'influence génétique, alors que les variations entre individus sont liées à l'influence de l'environnement. Cette méthode continue d'être utilisée et permet de définir des domaines génétiques qui influencent en commun une réponse particulière [84,85,465]. Le génotype étant obtenu par chance, l'interprétation de telles études a été discutée [92].

Une autre méthode historiquement très importante est la sélection et le croisement d'individus ayant montré une sensibilité particulière. On obtient des souches sensibles, résistantes, tolérantes, voir qui s'auto-administrent n'importe quelle substance d'addiction [86,88]. Cette méthode permet de découvrir, au hasard de la sélection, des lignées présentant une forte ou faible réponse, ou d'autres traits qui diffèrent entre les souches. Ce sont des réponses corrélées à la sélection, elles sont sous l'influence des mêmes gènes impliqués dans la réponse initialement sélectionnée. Cette technique permet donc de capturer des gènes dont l'influence était modeste. Elle a permis l'essor de la notion de groupes de gènes qui influencent en commun la réponse, de comprendre les réponses multiples liées à un gène et d'établir des mécanismes neurobiologiques d'une réponse à une drogue.



## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

L'inconvénient majeur et insurmontable de ces deux méthodes est lié au fait que les gènes capturés restent anonymes. Par conséquent, malgré leur capacité à montrer l'influence génétique sur la sensibilité ou la résistance même faibles aux drogues, l'identification spécifiquement des gènes reste difficile.

### **C- II- DE LA THÉORIE AUX GÈNES D'ACTUALITÉ**

Il a été reconnu que certaines personnes héritent de gènes qui les prédisposent à la sensibilité ou à la résistance au développement de l'alcoolisme ou d'autres dépendances. Cependant, les gènes qui ont une influence sont restés anonymes. C'est grâce au développement des outils modernes de la biologie moléculaire, du modèle de la souris transgénique et des techniques appliquées au projet du génome humain que l'identification de zones sur le chromosome contenant logiquement des gènes d'influence est devenue possible. La précision dans le ciblage des gènes de risque ou protecteur continue sa progression. Une fois ces zones, appelées QTLs (quantitative trait loci), ont été localisées, les gènes candidats dont les fonctions sont connues et qui sont aussi suspectés d'influencer les traits particuliers de la réponse étudiée sont vérifiés chez la souris par la délétion du gène (lignée 'Knock-out') et/ou par l'insertion pour une sur- ou sous-expression du gène (lignées transgéniques). Des limitations biologiques ont restreint ces approches à la souris, mais le rat a été utilisé dans une seule étude [63]. L'avancement de la connaissance de la structure du gène permet la conception et l'utilisation des oligo déoxynucléotides comme antisens (ou ODN) pour bloquer spécifiquement l'expression du messager du gène.

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

### **C- II- 1-      CARTOGRAPHIE DES “QTL”**

Par l'utilisation des stratégies de cartographie par étapes successives, plusieurs groupes ont localisé de multiples QTL (quantitative trait loci) ou loci jouant un rôle très important dans la modulation quantitative des réponses aux drogues sur plusieurs chromosomes de la souris.

La sensibilité à l'alcool est modulée par 5 QTLs [293] qui contrôlent plus de la moitié de la variabilité génétique des effets hypnotiques. Un groupe de gènes candidats potentiels inclue les gènes codant le récepteur de haute affinité de la neurotensine et les sous-unité  $\delta$  et  $\gamma$  des récepteurs nicotiques à l'acétylcholine (nAChRs). D'autres groupes ont cartographié les QTLs de la préférence de la boisson alcoolisée. Ils sont localisés sur les chromosomes 2, 9, 11 et 15 [27,87,303,310,379,429]. Le QTL sur le chromosome 9 détecté dans plusieurs études est proche des gènes codant le récepteur  $D_2$  de la dopamine et  $5HT_{1B}$  de la sérotonine.

La sévérité du sevrage aigu de l'alcoolisme a été cartographié avec 3 populations génétiques [52]. 3 QTLs ont été trouvés dans trois locations et sont capables de contrôler plus des 2/3 de la variabilité génétique de cette réponse : 1 QTL sur le chromosome 11 est proche d'un cluster de gènes codant les sous-unités  $\alpha 1$ ,  $\alpha 6$  et  $\gamma 2$  des récepteurs de l'acide  $\gamma$ -amino-butyrique (GABA). Les gènes codant les récepteurs du GABA, le principal neuromédiateur inhibiteur, seraient donc des candidats impliqués dans la convulsion liée au sevrage aigu de l'alcool qui ont été cartographiés dans cette étude. La cartographie des gènes affectant d'autres réponses à l'alcool a été rapportée [51].

Les QTLs du sevrage chronique de l'alcoolisme ont été cartographiés de façon provisoire [83]. 1 QTL a été localisé sur la même région du chromosome 1 définitivement cartographiée dans l'étude des QTL du sevrage aigu de l'alcoolisme [52].

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

---

Les QTLs provisoires des autres propriétés de renforcement de l'alcool autres que sa boisson, comme le conditionnement de type place préférence (CPP), l'aversion conditionnée au goût (CTA), la stimulation motrice et sa sensibilisation [95,96,380,426], sont en cours de confirmation et leurs liens sont en cours d'évaluation sur des populations génétiques.

La technique de la cartographie génétique a surtout été utilisée pour les opiacées. La différence de sensibilité à la morphine dépend fortement des facteurs génétiques [316,465]. 3 QTLs affectent significativement la préférence des boissons contenant la morphine et contrôlent collectivement plus de 85% de la variance génétique. Ces QTLs ont été cartographiés sur les chromosomes 1, 6 et 10 [32]. Le QTL sur le chromosome 10 est proche du locus du récepteur  $\mu$  des opiacées suggérant que ce récepteur est bien le QTL cartographié. D'autres traits de la sensibilité à la morphine ont été étudiés avec les mêmes souches BXD RI de souris qui ont servi à la cartographie des QTLs des effets de l'alcool [24]. Un QTL influençant les effets de la morphine sur l'analgésie et l'hypothermie a été cartographié dans la région proximale du chromosome 10 [26]. D'autres différences dans le fonctionnement du système opiacé entre les souches C57B/6 et DBA/2 de souris et autres modèles génétiques sont en accord avec l'hypothèse du rôle du récepteur  $\mu$  dans la médiation des effets de la morphine [316].

La sensibilité aux effets des autres drogues est différente suivant les souches [86,294,330]. Des QTLs provisoires ont été cartographiés pour les effets de la cocaïne incluant la crise, la sensibilité motrice et sa sensibilisation [313,381,504], l'activité de la méthamphétamine, la stéréotypie, et ses effets thermiques [8,155], les effets moteurs de la phencyclidine [8] et les effets du monoxyde d'azote [25,399].

En résumé, quelques QTLs ont été cartographiés définitivement, mais la majorité reste à vérifier. Certains gènes attractifs, candidats des QTLs, ont été identifiés, mais les tests fonctionnels évaluant leur rôle potentiel dans la médiation des effets des drogues sont en cours. Cependant, pour

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

la plupart, la cartographie des QTLs est à peine entrée au stade où toute l'énergie est concentrée pour cerner l'intervalle de confiance de la localisation génomique cartographiée. Cet intervalle doit être réduit jusqu'à une limite acceptable avant que les gènes de cette zone, responsables des effets des drogues, soient isolés, clonés et leurs rôles identifiés.

### **C- II- 2- MANIPULATION MOLÉCULAIRE DES GÈNES CANDIDATS**

La souris portant une mutation unique sur un gène est devenue, de plus en plus, un outil indispensable pour l'étude des mécanismes déterminant la sensibilité aux drogues de dépendance. Par le passé, les chercheurs devaient se contenter des mutations spontanées ou induites chimiquement pour étudier les effets d'un gène. Alors que ces modèles sont encore utilisés [170], il est plus avantageux de cibler un gène intéressant pour altérer sa fonction plutôt que de se contenter d'un processus stochastique pour révéler les effets d'un gène informatif. Durant ces dernières années, plusieurs gènes candidats ont été étudiés pour leur influence potentielle sur les traits des réponses à une drogue. Certains ont été indiqués par les études cartographiques, comme les gènes codant le récepteur D<sub>2</sub> de la dopamine et le récepteur de la sérotonine 1B, d'autres ont été suggérés par les données historiques les impliquant dans une réponse, comme le gène codant la sous-unité  $\gamma_{2L}$  du récepteur GABA<sub>A</sub>.

### **C- II- 3- ÉTUDES AVEC LES ANTISENS ou ODN**

Le système opiacé du cerveau a été étudié avec les souches génétiques classiques [316]. Le système opiacé a le plus bénéficié de l'approche avec les oligodésoxynucléotides antisens (ou ODN pour bloquer l'expression du messager). Des approches modernes ont été utilisées pour étudier le

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

rôle des récepteurs  $\mu$  et  $\delta$  dans la sensibilité à la douleur, les effets analgésiques des opiacées, la dépendance,...[51,373]. On note peu de travaux récents.

Le traitement par les ODN's du récepteur  $\delta$  bloque l'effet des agonistes sur l'analgésie et inhibe la tolérance et la dépendance aiguë à la morphine [213,536]. Il bloque également l'effet de la cocaïne dans le test CPP [494]. Le traitement par les ODN's du récepteur  $\delta$  et  $\mu$  montre que le syndrome de retrait des opiacées dépendant du récepteur  $\mu$  est modulable par le récepteur  $\delta$  [443]. Le traitement par les ODNs d'exons particulier du récepteur  $\delta$  a permis de différencier l'origine spinale ou supra spinale de l'analgésie induite par le DPDPE ([D-Pen2,D-Pen5]enkephaline) [436]. Le traitement par les ODNs du récepteur de la dopamine D2 réduit le nombre de récepteurs D2 et augmente l'effet moteur (rotation) de la cocaïne [468].

Le traitement par l'ODN de la sous-unité  $\alpha 6$  du récepteur nicotinique réduit les effets moteurs de la nicotine [251].

Par ailleurs, l'approche par les ODN's présente des avantages et des inconvénients [537].

### **C- II- 4- ETUDE AVEC LES LIGNEES KNOCK-OUT ET TRANSGENIQUES**

**C- II- 4- 1- Gène du récepteur 1B de la sérotonine** Il existe plus de 15 récepteurs distincts pour la sérotonine (5-HT). Les résultats expérimentaux suggèrent un rôle pour la 5-HT dans la modulation de plusieurs effets de l'alcool. Cependant, lequel des récepteurs de la 5 HT est impliqué dans cette modulation reste à démontrer. Le récepteur 5-HT<sub>1B</sub> (homologue de 5-HT<sub>1D $\beta$</sub>  humain) est pré synaptique avec une fonction autorécepteur inhibitrice par rétrocontrôle de la libération de la 5HT, et hétérorécepteur, inhibitrice de la libération d'un autre neuromédiateur. Il permet de rétablir l'homéostasie du cerveau. Les interférences avec le récepteur 5-HT<sub>1B</sub> va avoir des effets sur un grand nombre de voie de signalisation. Les hétérorécepteurs 5-HT<sub>1B</sub> sont localisés sur des

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

---

terminaisons nerveuses GABAergiques (inhibitrice) qui projettent du nucleus accumbens (NA) à l'aire ventrale tegmentale (VTA). Ces noyaux sont médiateurs des effets de récompense liés à la consommation des drogues [232].

Les souris  $5HT_{1B}/KO$  sont très agressives [448] avec une altération de la libération de 5HT dans différentes régions cérébrales [386,508]. La cartographie des QTL's avait montré la présence d'un gène influençant la consommation d'alcool sur le chromosome 9 proche du gène codant le récepteur  $5HT_{1B}$ . Les souris  $5HT_{1B}/KO$  consomment 2 fois plus d'alcool (jusqu'à 20 % v/v) [89] et sont identiques à la souche sauvage dans les tests de contrôle de qualité. Ces résultats suggèrent que le gène codant le récepteur  $5HT_{1B}$  module donc d'une certaine manière la consommation d'alcool [89].

Les souris  $5HT_{1B}/KO$  n'ont pas de préférence, au contraire de la sauvage, pour l'environnement associé à l'alcool dans le test CPP (Conditioned Place Preference). Elles sont donc moins sensibles à l'effet renforçateur de l'alcool et développent, comme les sauvages, une aversion à l'alcool dans le test CTA (Conditioned Taste Aversion) [425].

Ce modèle indique que des précautions sont à prendre dans l'interprétation des études utilisant des modèles transgéniques dans des essais comportementaux pour analyser des concepts psychologiques. En effet, la même lignée  $5HT_{1B}/KO$  montre une augmentation de la préférence, une atténuation de la CPP et une présence de CTA ; trois indices des effets renforçateurs de la consommation d'alcool. Ceci démontre que le renforcement n'est pas un phénomène mono couche au moins à l'échelle de son contrôle génétique. Cette lignée développe également plus rapidement que la sauvage l'injection intraveineuse de cocaïne, mais dans des proportions quantitatives identiques [428]. Elle montre une moindre stimulation du gène précoce c-fos dans des régions cérébrales et le striatum [276]. Cependant, le lien de l'induction du gène c-fos avec l'auto-injection de cocaïne reste à démontrer.

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

---

**C- II- 4- 2- Gènes des récepteurs de l'acide  $\gamma$ -amino butyrique ou GABA** Les récepteurs GABA<sub>A</sub> sont suspectés jouer des rôles médiateurs des effets aigus et chroniques de l'alcool [50,167]. L'isoforme  $\gamma$  de la protéine kinase C (PKC $\gamma$ ) est supposée être l'intermédiaire des effets de l'alcool sur les neurones GABAergiques [166]. Les souris PKC $\gamma$  /KO sont moins sensibles aux effets de l'alcool sur la sédation (réflexe de stature) et l'hypothermie. En parallèle, in vitro les neurones GABAergiques de ces souris PKC $\gamma$ /KO montrent une réponse plus faible à l'alcool. Cependant, les souris PKC $\gamma$ /KO et la souche sauvage répondent de façon identique à l'action de drogues qui agissent sur les neurones GABAergiques pour produire la sédation comme le pentobarbital et le diazepam. La spécificité du gène de la PKC $\gamma$  dans la différence de sensibilité à l'alcool est moins probable [166]. Alors que ces résultats suggèrent une cible spécifique de l'action de l'alcool sur le système GABAergique, des résultats plus récents suggèrent l'inverse. La sous-unité  $\alpha 6$  du récepteur GABA<sub>A</sub> est aussi impliquée dans certains effets de l'alcool. Par exemple, une étude de cartographie des QTL's d'influence sur la sévérité du syndrome de retrait de l'alcool a trouvé un lien très fort avec le chromosome 11 à proximité des gènes codant les sous-unités  $\alpha 1$ ,  $\alpha 6$  et  $\gamma 2$  du récepteur GABA<sub>A</sub> de la souris [52]. Des études récentes ont montré l'effet de la délétion du gène codant la sous-unité  $\alpha 6$  ( $\alpha 6$ /KO) [184,185]. La lignée obtenue et la lignée sauvage ne montrent aucune différence de sensibilité aux effets sédatifs (réflexe de stature) de l'alcool, du pentobarbital et des anesthésiques volatiles. Ceci montre que la sous-unité  $\alpha 6$  n'est un déterminant absolu des effets de l'alcool ni sur la sédation (hypnotique) [184], ni sur sa tolérance en chronique, ni même sur la sévérité de la convulsion lors du retrait [185]. La lignée  $\gamma 2$ /KO perd la sensibilité au diazepam [160].

La lignée portant une délétion de la sous-unité longue  $\gamma 2L$ , isoforme de  $\gamma 2$ , montre plus d'anxiété avec une plus grande sensibilité aux effets hypnotiques de midazolam et de zolpidem, mais aucune différence de sensibilité aux effets du pentobarbital et de l'ectomidate. Plusieurs autres

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

réponses à l'alcool ne sont pas différentes entre la lignée sauvage et  $\gamma 2L/KO$ . Ces expériences suggèrent que  $\gamma 2L$  n'est pas un déterminant absolu de la modulation des effets de l'alcool via le récepteur  $GABA_A$  [185]. Le rôle des sous-unités des récepteurs GABAergiques dans la médiation des effets de l'alcool et autres drogues a été discuté par Harris et al., [167].

**C- II- 4- 3- Gènes affectant la fonction dopaminergique** Le rôle des gènes codant les sous-types de récepteur de la dopamine, de ses transporteurs et de ses précurseurs dans la médiation des effets des substances d'addiction, a été vérifié par les méthodes de ciblage génétique [51]. L'interruption ciblée, par recombinaison homologe, des gènes codant les récepteurs de la dopamine (D1, D2, D3 et D4), de ses transporteurs et de la tyrosine hydroxylase (TH), modifie la sensibilité à l'éthanol, aux psycho-stimulants et aux substances d'addiction. Par exemple, la lignée D2/KO consomme volontairement moins d'alcool, elle est insensible à la dépression motrice et à l'ataxie induites par l'alcool [381]. Une autre lignée D2/KO indépendante de la première n'a montré aucune modification de sa sensibilité aux effets de la morphine sur la motricité mais le développement de la préférence de morphine dans le test CPP était défectueux [282]. Ces résultats suggèrent que la délétion complète du gène codant le récepteur D2 réduit l'effet de récompense des drogues. Cependant, le rôle du gène codant le récepteur D2 dans l'alcoolisme reste controversé [142,375]. D'un autre côté, le rôle des variations naturelles dans les allèles du gène D2 dans le développement des addictions a gagné de l'intérêt, donc d'autres récepteur D2-like pourraient jouer un rôle.

La lignée D3/KO est plus sensible aux effets moteurs de la cocaïne et de l'amphétamine et, elle est plus sensible que la souche sauvage dans le test de la CPP de l'amphétamine [555]. Le gène codant le sous-type D3 a été impliqué dans les effets de renforcement des drogues, particulièrement de la cocaïne [57].



## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

---

La lignée D4/KO est plus sensible aux effets moteurs de l'éthanol, de la cocaïne et de la méthamphétamine [439].

La lignée D1/KO montre une réduction des effets aigus de la cocaïne sur la motricité et la stéréotypie [554], alors que le test de la CPP de la cocaïne est normal [312]. Le développement de la sensibilité aux effets de l'amphétamine est aussi réduit dans cette lignée [91]. Enfin, il n'y a pas d'induction de c-fos, jun-B, Zif268 ni de up régulation de l'expression de la dynorphine dans les neurones du striatum de la lignée D1/KO [110,324].

La délétion du gène de la tyrosine hydroxylase (TH) produit une déplétion de la dopamine et de la noradrénaline, un phénotype létal [565]. On a donc ciblé la délétion du promoteur de la dopamine  $\beta$ -hydroxylase pour interrompre l'expression de la TH dans les neurones dopaminergiques uniquement. L'administration de L-DOPA restaure le phénotype TH dans les neurones noradrénergiques [564]. À notre connaissance, cette lignée n'a pas servi pour évaluer les effets des drogues d'addiction, mais les souris transgéniques avec une insertion du gène TH humain ont montré une moindre sensibilité aux effets de la méthamphétamine et de la nicotine sur la motricité [334]. La sur-expression du gène de la TH dans cette lignée semble supprimer la fonction dopaminergique normalement associée à l'hyperactivité.

La lignée HPRT/KO dans laquelle le gène de l'hypoxanthine guanine phosphoribosyltransférase est knock-out montre une augmentation de la sensibilité aux drogues stimulant la libération de la dopamine mais pas celles qui inhibent sa capture [196].

La lignée DAT/KO montre que la délétion du gène du transporteur de la dopamine (DAT) produit une moindre sensibilité aux effets moteurs de la cocaïne et de l'amphétamine [148].

Enfin, la lignée VMAT/KO montre que la délétion du gène du vesicular monoamine transporter (VMAT) produit chez l'hétérozygote une plus grande sensibilité aux effets moteurs de

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

l'amphétamine avec une diminution de la CPP de l'amphétamine et une plus grande sensibilité à la toxicité du MPTP sur les neurones de la substance noire [495].

En résumé, les résultats obtenus avec les multiples modèles génétiques du système dopaminergique ne sont pas complets. Ils montrent un rôle large de la fonction dopaminergique dans les effets des drogues d'addictions, mais le futur nous dira comment la dopamine influence la sensibilité au développement des addictions.

**C- II- 4- 4- Neurotoxicité des monoamines** Les substances d'addictions ont la propriété de renforcement, d'aversion et de toxicité. Les phosphoglycoprotéines (PGP) ou multidrogue résistance (*mdr*) affectent la résistance des cellules à la toxicité des drogues. Multiples variants de PGP ont été détectés dans divers tissus de la souris à l'homme [290]. Des lignées avec une délétion d'une copie fonctionnelle d'un de ces gènes ont été générées et la délétion de *mdr1a* résulte dans une absence de détection de PGP au niveau de la barrière hématoencéphalique (importante dans l'extrusion des drogues des cellules). Des doses faibles de méthamphétamine produisent une neurotoxicité par déplétion de la dopamine et de son transporteur chez la souris *mdr1a*/KO. Cependant, des doses faibles de méthylène dioxyméthamphétamine (MDMA) produisent une déplétion plus large de DAT, sans affecter les niveaux de dopamine, chez la souche sauvage [290]. Aux fortes doses, les deux lignées montrent une neurotoxicité équivalente aux deux drogues. Ces résultats montrent un mécanisme d'entrée des drogues neurotoxiques dans le cerveau et des interactions différentes avec les PGP. Le produit d'autres gènes peut participer à cette neurotoxicité.

La protéine p53 est impliquée dans l'apoptose ou mort programmée des cellules [326]. Après injection de la méthamphétamine, l'homozygote p53/KO est protégé de la déplétion légère de la sérotonine observée chez la souche sauvage [178] et la déplétion de DAT est modérée. De plus,

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

l'immune réactivité de p53 est augmentée chez la souche sauvage uniquement. P53 joue donc un rôle dans la neurotoxicité de la méthamphétamine [177].

**C- II- 4- 5- Gènes affectant le système opiacé** La délétion du gène codant le récepteur  $\mu$  atténue l'effet analgésique et la CPP de la morphine et bloque son syndrome de retrait [299]. Les souris transgéniques sur-exprimant le gène SOD (superoxyde dismutase) montrent une augmentation du nombre de récepteur  $\mu$  et une plus grande stimulation par les opioïdes et ils travaillent plus pour obtenir la morphine [118].

La délétion du gène de la pré-proenkephaline altère l'analgésie [230] et les souris  $\mu$ /KO perdent leur sensibilité analgésique à la morphine [478].

La délétion des sous-unités  $\alpha$  et  $\Delta$  de CREB (AMPC responsive element binding protein) n'a d'effet ni sur l'activité de liaison des récepteurs  $\mu$  ni sur la sensibilité analgésique à la morphine cependant, la lignée CREB/KO montre une atténuation frappante des effets de la naloxone sur la précipitation du syndrome de retrait de la morphine [281].

**C- II- 4- 6- Manipulations d'autres gènes** La délétion de Fyn, qui code pour une tyrosine kinase (TK), permet d'estimer le rôle des récepteurs du *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) dans la sensibilité à l'alcool [315]. À métabolisme égal, la lignée Fyn/KO est plus sensible aux effets de l'éthanol. Les implications de ce mécanisme dans l'action de l'alcool ont été discutées [167].

La lignée sur-exprimant le facteur TGF $\alpha$  (transforming growth factor) est plus sensible aux effets sédatifs de l'alcool et plus agressive sauf aux fortes doses d'alcool [175].

Les lignées surexprimant le facteur IGF-I (Insulin-like growth factor-I) ou sa protéine de liaison 1 (IGF-I-BP1) ont été générées [396]. La lignée IGF-I est plus sensible alors que la lignée IGFI-BP1 est moins sensible aux effets de l'alcool, sans différence de sensibilité entre les deux

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

souches quant aux effets de l'alcool sur l'ataxie et l'hypothermie. L'administration chronique d'éthanol ne développe aucune tolérance chez la souche IGF-I alors que la souche IGFI-BP1 est plus tolérante aux effets hypothermiques et hypnotiques de l'alcool [396].

La délétion de la sous-unité  $\beta 2$  des récepteurs nAChRs réduit les effets de la nicotine sur le renforcement [384], l'analgésie supraspinale sans affecter l'effet analgésique de la morphine [296] et augmente la dégénération neuronale durant la vieillesse de la souche [569]. La délétion de la sous-unité  $\alpha 4$  des récepteurs nAChRs réduit les effets analgésiques de la nicotine d'origine supraspinale mais pas spinale mais, n'a pas d'effet sur l'analgésie de la morphine [80,296].

La délétion de gène de la CGRP (calcitonin gene-related peptide) réduit l'analgésie de la morphine chez la souche mutante mais seulement d'origine spinale [441].

**C- II- 4- 7- Interprétation des résultats de manipulation de gènes** L'interprétation des résultats obtenus avec les lignées transgéniques et knockout doit tenir compte du fait que l'absence ou l'insertion de gènes a eu lieu durant tout le développement neurobiologique de la lignée. De ce fait, une adaptation dans un ou plusieurs autres systèmes neuronaux, par compensations fonctionnelles pour la cible modifiée, a pu avoir pris place. Cette éventualité pourrait être prouvée directement par l'insertion de séquences qui permettront d'allumer et d'éteindre un gène dans certaines conditions, par exemple par un traitement avec un antibiotique.

L'éventualité que les gènes dits voyageurs, des cellules embryonnaires fortement liés au gène étudié vont être transférés avec lui et participer à la création des lignées transgéniques et knockout est réelle [143,537].

Par exemple des souris hyperactives Colomba (Cm/+) qui ont une mutation spontanée ont été corrigées lors de leur utilisation pour recevoir le gène SNAP-25 [170]. C'est le seul exemple d'une telle correction jamais encore atteint pour les drogues étudiées jusqu'à présent.

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

### **C- II- 5- AUTRES APPROCHES GÉNÉTIQUES NOUVELLES**

Finalelement la cartographie de l'expression régionale de c-fos dans des lignées avec différents génotypes et qui diffèrent par la sensibilité à l'éthanol a été utilisée. Dans une étude, deux lignées présentant une différence de sensibilité à l'éthanol ont été comparées pour élucider le rôle des différentes régions cérébrales dans la grande sensibilité de la lignée DBA/2J et l'insensibilité de la lignée C57BL/6J à l'effet moteur de l'alcool [180]. Des doses faibles et modérées d'éthanol augmentent l'immune réactivité c-fos-like dans les régions limbiques (central amygdala) mais pas dans les ganglions de la base chez la souche DBA/2J. Les lignées de rats P et AA ont une forte préférence à l'alcool par opposition aux lignées NP et ANA qui évitent l'alcool. Les lignées P et AA répondent moins que les lignées NP et ANA à l'administration de l'alcool dans le locus coeruleus, suggérant que cette région cérébrale joue un rôle dans la consommation d'alcool [501].

L'utilisation de l'expression des gènes précoces pour attribuer un rôle aux différentes régions cérébrales dans les effets des drogues est une démarche attractive [82]. Elle permettra d'étudier les mécanismes d'action des drogues. L'hippocampe semble très sensible à l'action de l'alcool [440] et le traitement par les ODN's de c-fos bloque l'effet moteur de la cocaïne [168]. Les études d'expression des gènes codant des protéines influençant les effets des substances d'addiction et autres drogues ont constitué un pilier à la base des études génétiques récentes sur l'alcoolisme [167].

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

### **C- III- CONCLUSIONS**

La révolution génétique a eu un impact fondamental sur la bio médecine. Des gènes nouveaux impliqués dans des maladies sont quotidiennement identifiés et, ou, clonés. Actuellement, des progrès rapides ont été réalisés pour les maladies génétiquement simples où un seul ou quelques gènes seulement déterminent le phénotype de la maladie. Les Neurosciences des substances d'addictions ont bénéficié des nouvelles approches génétiques pour faire des progrès réels, comme nous venons de le voir. Ce domaine est idéal pour les études génétiques futures des caractères complexes. Les substances d'addictions ne seraient rien si elles n'étaient complexes et aux différentes échelles de la complexité. L'identification et la manipulation d'un seul gène ne suffisent pas pour expliquer les différences individuelles à la susceptibilité aux addictions. Cependant, ce domaine pourra bénéficier de la riche et longue histoire de la génétique classique des différentes susceptibilités aux substances d'addictions. La compréhension des mécanismes de la génétique classique fournit un contexte riche pour l'interprétation intelligente des nouvelles approches telle la délétion et l'insertion de gènes. Les résultats exposés représentent une vue du futur, mais le futur semble encore plus riche d'informations.

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

### **D- LA DÉPENDANCE DANS LA PERSPECTIVE ÉVOLUTIVE ET AIDES MÉDICALES**

Les drogues psychoactives pures et les voies directes d'administration sont des caractéristiques nouvelles de notre environnement. Elles sont inhérentes à la pathologie parce qu'elles court-circuitent les systèmes adaptatifs de traitement de l'information et agissent donc directement sur les mécanismes anciens du cerveau, ceux qui régulent l'émotion et le comportement.

Les drogues inductrices d'émotions positives donnent un faux signal de bonne aptitude. Ce signal détourne les mécanismes des sensations objectives du, "j'aime" et "je veux" et peut entraîner un usage continu de la drogue, qui ne produit plus de plaisir.

Les drogues inhibitrices des émotions négatives peuvent altérer nos défenses utiles, même s'il y a plusieurs raisons de l'innocuité de leur utilisation. Une connaissance approfondie de l'origine évolutive et du fonctionnement de l'émotion et de ses mécanismes neuronaux est nécessaire à la base de notre décision sur l'utilisation des drogues psychoactives.

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

Les mécanismes neuronaux qui régulent l'émotion et le comportement ont été formés par la sélection naturelle pour maximiser les aptitudes Darwiniennes, par conséquent les drogues psychoactives qui perturbent ces mécanismes doivent détériorer l'adaptation. Le bilan lourd des drogues d'addiction le démontre bien. Cependant, les drogues psychoactives peuvent améliorer l'adaptation dans certaines circonstances (que feraient certains scientifiques sans caféine), opposer les symptômes de maladies mentales et produire parfois un plaisir sans risque. Ici, nous considérerons l'utilisation et l'abus des substances du point de vue de la perspective de la médecine Darwinienne qui recherche les explications évolutives caractéristiques d'un dessein qui rend les organismes vulnérables aux maladies [340,545]. Dans cette perspective, les addictions sont le résultat des mécanismes du cerveau et des différences individuelles et sociales, mais elles sont aussi le résultat de l'évolution de notre vulnérabilité aux effets adaptatifs négatifs des drogues et des fonctions mêmes de l'émotion que les drogues influencent. Les émotions sont des états coordonnés, formés par la sélection naturelle, qui ajustent le comportement et la physiologie pour prendre avantage d'opportunités et de se débrouiller devant des menaces récurrentes à l'échelle de l'évolution [507]. Ainsi, les caractéristiques et la régulation des émotions de base égalent les besoins des situations spécifiques qui ont souvent influencé les aptitudes. Les émotions influencent la motivation, l'apprentissage et les décisions et, par conséquent, influencent le comportement et enfin les aptitudes [129,131,214,255,353]. Les sensations subjectives offrent une fenêtre, souvent déformée, dans la motivation, mais ne sont pas l'essence de l'émotion [33,255,333] et ne sont pas toujours un composant nécessaire [140,559]. Par exemple, dans l'étude du choix d'un goût imposé, les gens normaux commencent par éviter le choix pauvre et montrent une modification de conductance de la peau associée à l'émotion avant même d'être conscient de leur préférence [22]. Cependant, la balance subjective positive ou négative est un aspect saillant des émotions de base, avec différents états négatifs surpassant en nombre les états positifs. Ces observations sont en



## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

accord avec les origines des émotions en tant que états spécialisés formés pour nous aider à affronter les situations d'opportunité ou de gains et le plus souvent les situations de menace ou de perte. Ceci offre une explication évolutive potentielle pour l'indépendance relative des affects positifs et négatifs. Cette notion non intuitive a été bien documentée [31] et ceci suggère que l'effet des drogues psychoactives sur les émotions positives et négatives doit être considéré séparément [339].

### **D- I- LES DROGUES QUI STIMULENT LES ÉMOTIONS POSITIVES.**

Selon la psychologie de folk, l'abus des substances est expliqué par la tendance des humains à répéter les comportements qui apportent du plaisir ou arrêtent la souffrance. Cette explication globale est correcte mais incomplète [339]. La plupart des drogues d'addiction agissent sur des mécanismes neuronaux, anciens et remarquablement bien conservés, associés aux émotions positives qui ont évolué pour contrôler les comportements objectifs. L'héroïne, la cocaïne, l'alcool marijuana, amphétamine et leurs analogues de synthèse activent les neurones dopaminergiques mésolimbiques et les récepteurs opioïdes qui y sont associés dans le cerveau. Ce système peut-être considéré comme la monnaie neuronale courante de la récompense et le substrat pour la régulation des motivations [38,182,233,496,549]. Certaines molécules de la transmission sont utilisées par ces systèmes depuis 1 000 millions d'années [535]. Les neurotransmetteurs des mammifères, comme la dopamine, la sérotonine et la noradrénaline, sont également utilisés par le phylum des invertébrés, comme les mollusques et les arthropodes, qui ont divergé de la lignée des pré-vertébrés depuis environ 600 millions d'années. Le cerveau de la plupart des vertébrés possède des séquences d'ADN des récepteurs  $\mu$  opioïde-like [264], et même les cerveaux des vertébrés non mammaliens ont des systèmes mésolimbiques contenant des neurones à la dopamine qui partent du cerveau

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

moyen vers des régions dorsales et ventrales du complexe striatum [56]. Même si ces systèmes de neurotransmission ne remplissent pas les mêmes fonctions, certains d'entre eux pourraient jouer des rôles similaires dans des organismes très différents : la dopamine est le médiateur des comportements de nutrition de la limace aux primates, et une molécule similaire l'ectopamine est le médiateur des effets de récompense du sucrose chez l'abeille [391]. Cette conservation de la fonction des structures chimiques des signaux de récompense contraste avec la diversité des récepteurs [132,377], probablement parce qu'une mutation qui change un transmetteur peut perturber l'ensemble du système, alors que la duplication des gènes permet la différenciation des récepteurs qui graduellement prendront de nouvelles fonctions [19].

Les drogues d'addiction créent dans le cerveau un signal qui indique, faussement, l'arrivée d'un immense bénéfice dans les aptitudes. Ceci change l'attitude comportementale et la recherche de la substance d'addiction augmente en fréquence et déplace les comportements adaptatifs. D'autres aspects nouveaux de notre environnement moderne ont des effets similaires. Par exemple, les jeux vidéo déplacent plus nos comportements adaptatifs mais par des moyens psychologiques plutôt que par des moyens neurochimiques directs. Les aliments riches en lipides, sucres et sels ou les amuse-gueules ont tendance à se substituer aux aliments plus nutritifs dans notre bol alimentaire. Nous sommes vulnérables à la baisse de nos aptitudes objectives parce que notre cerveau n'est pas fait pour avoir un accès direct aux drogues pures, aux jeux vidéo et aux amuse-gueules [114]. Des centaines de générations d'expositions ont pu vraisemblablement former des résistances à leurs séductions et effets délétères. Beaucoup moins de temps serait peut-être suffisant, si le déficit génétique de l'alcool dehydrogénase dans beaucoup de populations asiatiques était vraiment un produit de la sélection de quelques milliers d'années d'exposition à l'alcool [473]. Pendant ce temps, l'inégalité entre notre corps et notre environnement moderne est la cause majeure des problèmes médicaux et comportementaux.

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Cette simple perspective laisse certains aspects inexpliqués des substances d'addiction. Par exemple lorsque l'addiction se développe, les plaisirs induits par les drogues déclinent ou restent constants, et bien même que la compulsion augmente et les conséquences maladaptatives s'accumulent, ce qui démontre que la poursuite du plaisir est une explication insuffisante. Une raison probable serait la séparation du système de récompense du cerveau mammalien en deux composantes qui correspondent en gros au « J'aime », le plaisir hédoniste de recevoir une récompense, et au « Je veux », la motivation objective et la poursuite comportementale de la récompense. Même si la nature de ces deux composantes commence à peine d'être comprise, il apparaît qu'ils ont des substrats neuronaux différents. Le « J'aime » des repas sucrés, par exemple, est véhiculé par certains systèmes opioïdes du cerveau arrière et des systèmes de la base du cerveau alors que le « Je veux » semble véhiculé par des neurones dopaminergiques mésolimbiques ascendants. La séparation neurale de la médiation du « Je veux » aurait évolué offrant différents « J'aime », pour la nourriture, le sexe, et autres incitations disproportionnées, et permettant la comparaison dans la même monnaie d'utilisation [464]. Le système « J'aime » est activé par la réception de la récompense alors que le système « Je veux » anticipe la récompense et motive le comportement instrumental. Quand ces deux systèmes sont exposés à la drogue, le « Je veux » motive la persistance de la poursuite de la drogue qui ne produit plus de plaisir, offrant ainsi une explication au cœur du paradoxe de l'addiction [339].

Un autre aspect de la physiologie qui nous rend vulnérable aux addictions est l'hypersensibilité des projections neuronales ascendantes dopaminergiques induite par les drogues d'addiction, quoique c'est aussi un mécanisme contrôlé par des facteurs génétiques et expérimentaux. Tout organisme ayant un système objectif régulé chimiquement et une certaine capacité technique est intrinsèquement vulnérable aux addictions. Mais de plus, les caractéristiques spéciales des systèmes de récompenses des vertébrés exagèrent le risque ce qui expliquerait le

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

phénomène bizarre des personnes dépendantes qui sacrifient toute chose dans la vie pour obtenir la drogue, qui en réalité n'apporte plus aucun plaisir, et qui retournent à la drogue même après de longues périodes d'abstinence [234].

Des implications importantes découlent de l'origine de notre vulnérabilité aux drogues d'addiction et de l'incompatibilité entre les mécanismes anciens et notre environnement moderne. De cette perspective évolutionniste, les variations individuelles qui augmentent la susceptibilité aux drogues d'addiction sont mieux décrites comme bizarreries que déficiences, parce qu'elles n'ont probablement pas eu d'effets délétères dans l'environnement ancestral [339]. Les différences génétiques forment les paramètres du système neuronal des comportements de base partagés par les individus d'une même espèce. Les différences non génétiques dans l'expérience de l'émotion peuvent aussi influencer la susceptibilité à l'usage de la drogue, ceci étant démontrée par la morbidité substantielle des substances d'addiction et les maladies post-traumatiques liées au stress. L'association forte entre les symptômes émotionnels et la susceptibilité aux addictions a été bien étudiée pour le tabagisme, et l'aptitude de la nicotine à lever ces sensations a été interprétée de façon sophistiquée dans la perspective évolutive [387]. Au lieu de chercher les explications de l'addiction dans les différences individuelles dans les gènes, le tempérament, les expériences précoces, les conditions sociales, les paramètres culturels, ou l'exposition aux drogues, la perspective évolutive suggère la prise en considération des interactions de ces facteurs avec les mécanismes de l'émotion et du comportement qui rendent les humains particulièrement vulnérables aux substances d'addiction. Ces travaux encouragent les thérapeutiques qui prennent en considération la diversité des facteurs qui influencent nos émotions, comme le relationnel, le support social, les inquiétudes sociales, l'expérience de la discrimination, et les opportunités ou leur blocage. Il est clair que les personnes qui ne réussissent pas la compétition sociale vont sentir plus d'émotions négatives que d'émotions positives, prendront plus souvent les drogues et seront aussi

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

moins sensibles aux traitements. Cette vue suggère également que la découverte de nouvelles drogues et voies d'administration va aggraver l'incompatibilité entre nos anciens mécanismes cérébraux et les drogues hyperactives. Enfin elle suggère que la guerre aux drogues d'addiction est raisonnablement loin d'être gagnée mais, nous pouvons utiliser notre savoir pour développer des stratégies sensibles pour la prévention et le traitement et des politiques pour arriver au bout d'un problème qui a toutes les chances de persister parce que son itinéraire nous mène directement au cœur même du plan de fonctionnement du système nerveux des humains [339].

### **D- II- LES DROGUES QUI BLOQUENT LES ÉMOTIONS NÉGATIVES**

La perspective évolutive a aussi des implications pour les drogues qui bloquent l'anxiété, la baisse de l'humeur, et autres émotions négatives. Les psychiatres pourraient avoir très vite dans leur arsenal des drogues qui contrôlent la souffrance émotionnelle comme d'autres drogues contrôlent la douleur, la toux, la fièvre, la diarrhée, et le vomissement. Notre connaissance est encore superficielle quand on se pose la question quand et comment nos réactions émotionnelles sont utiles, mais la connaissance de l'utilité de nos défenses physiques nous échappe également. Alors que la plupart des médecins ont compris que bloquer une toux chez un patient atteint d'une pneumonie peut entraîner la mort, d'autres savent que bloquer la diarrhée induite par la Shigella entraîne une lenteur de récupération et des complications [112]. Certains ne connaissent pas l'utilité des défenses comme la fièvre et la baisse des taux sanguins de fer au cours des infections [223,538] et d'autres ne différencient pas entre les manifestations des maladies qui sont des aspects de défense et celles qui proviennent d'une déficience de la machinerie du corps [340]. Ces difficultés sont exagérées en psychiatrie. L'utilité de l'anxiété est connue, mais souvent ignorée [154], celle de la jalousie demeure controversée et celles de la dépression et de la baisse de l'humeur sont à peine

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

considérées [147,304,338,392]. Les études quantitatives qui explicitement s'adressent à la fonction de l'émotion dans l'évolution ont commencé à peine à apparaître. Par exemple, des données récentes suggèrent que les sentiments d'embarras et de culpabilité régulent le rôle hiérarchique de l'individu dans un groupe [214]. Notre connaissance de la signification fonctionnelle des émotions négatives connaît une croissance lente alors que de nouvelles espèces de drogues psychotropes sont découvertes avec des pas de géants. Nous manquons de connaissances scientifiques sur l'émotion pour pouvoir conseiller en détail quand il faut ou il ne faut pas utiliser ces médicaments.

Nous avons cependant plusieurs raisons de penser que les psychotropes peuvent souvent être sans danger et utiles, même si le rendement des émotions négatives est adaptatif. Premièrement, il y a des états pathologiques où la drogue peut normaliser ou compenser la pathologie, par exemple l'aptitude du lithium à prévenir la manie. Deuxièmement, il y a des réponses émotionnelles douloureuses normales qui n'ont plus d'utilité dans notre environnement moderne comme la douleur lors d'une opération chirurgicale. Une attaque de panique peut sauver un chasseur en fuite à la vue d'un lion, mais peut coûter la vie à un conducteur sur une voie d'autoroute. Troisièmement, le corps a des défenses redondantes, par conséquent le blocage d'une émotion négative peut n'avoir que peu de conséquences délétères, comme le blocage de la fièvre ne retarde pas forcément la guérison d'une infection. Quatrièmement, les systèmes biologiques régulant l'expression de la défense doivent, en vertu des principes de détection des signaux, être construits pour manifester la défense chaque fois que, en moyenne, ça vaut la peine. Parce que plusieurs défenses ne coûtent pas cher, mais protègent contre des menaces fatales potentielles dont la présence est signalée par des signes peu sûrs, même un système optimal produira beaucoup de fausses alarmes [339]. Comme le vomissement, qui peut éliminer une toxine potentiellement fatale au prix de perdre quelques centaines de calories, la peur et la baisse de l'humeur peuvent abaisser la tendance des comportements qui sont dangereux ou inutiles. Finalement, le cerveau n'était pas conçu pour le

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

bénéfice des individus mais de leurs gènes. Comme Wilson l'avait posé, « L'amour raccorde les haines, l'agression, la peur, l'expansion, le retrait, et encore, dans des mélanges désignés non pour promouvoir le bonheur de l'individu, mais pour favoriser la transmission maximale des gènes contrôleurs » [547].

Ces considérations permettent d'entrevoir, et même de prédire, un futur dans lequel les drogues vont éliminer aussi bien les souffrances émotionnelles normales et pathologiques, parce que maintenant elles éliminent la souffrance physique. D'un autre côté, les mêmes facteurs amoindrissent la vue simpliste, défendue par certains psychiatres et compagnies pharmaceutiques, que les émotions aversives intenses résultent tout le temps d'anormalités cérébrales. Certaines anxiétés et baisses de l'humeur sont originaires de déficiences cérébrales, mais bien d'autres sont le résultat de cerveaux normaux et résultent d'un déséquilibre dans la balance de la chimie cérébrale dans le même sens du superflu qu'une toux résulte d'une activité excessive des centres de contrôle de la toux. De plus, ce n'est pas parce qu'une drogue bloque une émotion négative que cette émotion est anormale, ni que la drogue agit par réversion d'une déficience cérébrale. L'aspirine, après tout, réduit la température corporelle uniquement chez ceux qui ont la fièvre, mais la fièvre est une défense contre une maladie et non une maladie elle-même.

### **D- III- CONCLUSIONS**

Les capacités émotionnelles ont évolué pour augmenter la performance Darwinienne des individus qui recherchent les ressources et évitent les dangers. La poursuite de buts associés aux émotions tend à placer les organismes dans un gradient hédoniste et adaptatif, mais les systèmes neuronaux du comportement ont été désignés pour maximiser nos performances Darwiniennes, pas nos joies, de sorte que nos plaisirs sont souvent éphémères et nous ressentons une souffrance

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

inutilement. Les systèmes neurochimiques médiateurs de ces états nous confèrent une vulnérabilité intrinsèque aux drogues d'addictions là où elles sont disponibles. Une meilleure compréhension des mécanismes, de l'origine et des fonctions des émotions, permet d'améliorer nos capacités à mieux affronter les substances d'addiction et notre sagesse à prendre des décisions quant aux utilisations thérapeutiques des drogues psychoactives.

### **D- IV- APPROCHES THÉRAPEUTIQUES**

Les approches modernes du traitement des addictions ont été influencées par plusieurs facteurs importants. Ces facteurs incluent l'avancement dans notre connaissance de la nature des addictions, basée sur des études longitudinales, et les progrès dans l'élucidation de la biologie des comportements de dépendance. De plus, les changements dans les politiques de santé public ont commencé à former notre manière de traiter les dépendances.

La dépendance est couramment définie comme une tolérance et une dépendance physique à une drogue d'addiction. La tolérance représente une adaptation à l'exposition répétée d'une drogue de telle sorte que la réponse pharmacologique est diminuée [125]. La dépendance physique est un état caractérisé par les symptômes de retrait lorsque la prise de la drogue est arrêtée ou significativement réduite. Les symptômes de retrait tendent à s'opposer quasiment aux effets initiaux de la drogue, et apparaissent dès que la drogue commence à disparaître du corps sous l'effet du métabolisme et de l'excrétion [348]. Si la tolérance et les symptômes de retrait étaient les seuls problèmes d'une personne dépendante, le traitement consisterait à détoxifier pour nettoyer le corps et à donner des médicaments pour bloquer les symptômes de retrait [348]. Si la prise de drogue ne refait pas surface, les mécanismes de l'homéostasie vont graduellement se réadapter à l'absence de



## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

drogue [252]. Maintenant nous savons que la détoxification est, au meilleur, une première étape dans le traitement et que l'abstinence est rarement obtenue, le plus difficile est la prévention de la rechute.

Il est important de noter que la tolérance et les symptômes de retrait se manifestent également chez les personnes non dépendantes traitées par un médicament commun auquel l'organisme s'adapte. Ceci concerne les médicaments de l'hypertension, l'anxiété et la douleur. De plus de peur de produire une addiction, la douleur est sous-traitée [75] même en phase finale d'un cancer, ce qui peut alimenter le débat sur le suicide assisté (euthanasie). Des patients sont laissés à leur douleur inutilement alors que les traitements de la douleur sont disponibles, à cause de la peur de l'addiction et par conséquent, le suicide semble être le seul alternatif possible [126].

Si la tolérance et la dépendance physique n'étaient pas le cœur de l'addiction, alors qu'elle est la meilleure définition ? Comme la définition a évolué [125], l'addiction est un syndrome caractérisé par la compulsion du comportement toxicomane de recherche de la drogue qui résulte dans l'altération des fonctions sociales et psychologiques ou dans des dommages sanitaires. Alors qu'initialement l'usage de la drogue est volontaire, l'individu, une fois dépendant, est assailli par l'urgence presque irrésistible de continuer ou de reprendre la prise de la drogue. Même après une détoxification et une période longue d'abstinence, la rechute se produit fréquemment malgré l'effort sincère d'abstinence. Les gens ou les situations associées auparavant à la prise de drogue produisent des réactions involontaires et pourraient provoquer la rechute [351,544]. Les mécanismes biologiques de ce comportement apparemment réflexe ont suggéré des études sur l'animal au niveau neurochimique [234] et moléculaire [343]. Cliniquement, le profil de ces comportements est caractérisé par un retour répété à la prise de la drogue qui est souvent

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

manifestement une auto destruction. Un point clef à comprendre par les cliniciens est que l'enclin à la rechute est basé sur les changements des fonctions du cerveau qui persistent des mois voir des années après la dernière prise de la drogue. En réalité, ces changements des fonctions du cerveau vont interagir avec des facteurs environnementaux comme le stress social et les situations qui le déclenchent.

Les confusions sur le diagnostic et le pronostic de l'addiction proviennent du fait que les personnes dépendantes se présentant au traitement ont des complications sociales et psychologiques qui cachent le processus de l'addiction. Le patient typique évolue d'une utilisation à un abus de la drogue et à une dépendance au cours d'une période de plusieurs années. Au cours de cette période, il est souvent le cas que des problèmes sociaux, professionnels, familiaux, médicaux et légaux se développent. L'Index de la Sévérité de l'Addiction [305] contient sept classes de variables qui sont mesurées pour obtenir l'indice de sévérité. Les patients se situant au plus haut de l'échelle, sur la base de la quantité de drogue utilisée et pas sur d'autres dimensions, ont le pronostic le plus favorable. Au contraire, les patients ayant des complications psychosociales sévères en dehors du domaine de la drogue ont le plus mauvais pronostic et rechuteront indépendamment de leur niveau de sévérité dans l'usage de la drogue [551].

Des maladies psychiatriques coexistent souvent avec l'addiction. Celles-ci incluent les désordres de l'anxiété, psychotiques et affectifs comme la dépression. Même si certains de ces diagnostics, appelé « diagnostics duels », sont simplement une occurrence de coïncidence de désordres communs, la superposition est plus forte que ne le prédit le simple fait du hasard sur la base de la prévalence dans la population [212]. Il y a deux types de relations, et chacune se rencontre probablement dans différents groupes d'utilisateur de drogues. La préexistence d'un

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

désordre psychiatrique pourrait augmenter la vulnérabilité de l'individu à initier l'usage de la drogue comme une automédication des symptômes psychiatriques [216]. La seconde possibilité est le fait que l'usage chronique de la drogue modifie le cerveau et les interactions sociales qui prédisposent l'individu au développement des maladies psychiatriques. Cette dernière hypothèse a été supportée par l'observation que plusieurs symptômes psychiatriques associés aux désordres des dépendances commencent après le processus d'addiction et se résolvent spontanément après quelques semaines d'abstinence de l'usage des drogues [451,452]. S'ils ne résolvent pas, ces désordres psychiatriques associés devraient être traités par les psycho-stimulants spécifiques.

Comme notre compréhension de la nature chronique des désordres des addictions a augmenté, il apparaît clair que les traitements devraient se baser sur un modèle de maladie chronique comme utilisé pour le traitement du diabète ou de l'asthme plutôt qu'une maladie aiguë comme la pneumonie. Le shift d'un modèle de traitement aigu ou de courte durée vers un modèle de traitement chronique est en cours de réalisation, et rencontre des résistances. Aux USA, le système sanitaire est traditionnellement prêt pour une détoxification plutôt que pour la prévention des rechutes à long terme.

### **D- V- LES DIFFERENTS TRAITEMENTS**

La notion de traiter médicalement le problème des addictions a été controversée par le passé, la philosophie de certains s'y oppose [335]. Si on admet que l'usage chronique de la drogue produit des changements de longue durée dans le cerveau, il est naturel de chercher le traitement qui combat les effets de la lésion et facilite l'approche par des traitements comportementalistes [133]. Les traitements comportementalistes sont encore nécessaires pour s'occuper des aspects

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

psychologiques du désordre, mais les deux approches peuvent marcher ensemble. Les efforts de la recherche ont fourni des médicaments pour traiter la dépendance aux opioïdes, à la nicotine ou à l'alcool [349]. Ces traitements sont présentés selon leur catégorie et leur mécanisme. Les traitements peuvent aider au cours de la détoxification et pour prévenir les rechutes. Même si des développements intéressants ont été réalisés dans le domaine des traitements de la dépendance à la cocaïne et autres stimulants, aucun traitement n'est encore disponible. Pour les stimulants, les hallucinogènes, le tabac ou le cannabis, les traitements sont comportementalistes et les médicaments ne sont donnés que si un désordre psychiatrique coexistant est présent.

### **D- V- 1- LA DÉTOXICATION**

Paradoxalement, même si l'addiction est un désordre chronique, la détoxification est peut-être le seul élément couvert dans certains contrats d'assurances maladie. La détoxification est très utile comme traitement premier de la dépendance à la nicotine [124]. L'inconfort du retrait peut être relevé par une réduction graduelle des doses de nicotine délivrées dans les timbres transdermiques, les gommes à mâcher, ou le spray nasal. Après facilitation par la détoxification, la nicotine est parfois utilisée plusieurs mois comme traitement de blocage de l'envie et pour aider les anciens fumeurs à maintenir le sevrage [124].

Dans le traitement de la dépendance à l'alcool, la détoxification est très importante parce que la menace du syndrome de retrait est potentielle durant toute une vie. Il existe aussi des évidences que la sensibilisation se produit au cours du retrait de telle sorte que la répétition des retraits rende progressivement les symptômes plus sévères. Le traitement des symptômes au contraire pourrait retarder le processus de sensibilisation [47]. Les benzodiazépines suppriment effectivement le

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

syndrome de retrait, et avec une attention particulière aux électrolytes et vitamines, la plus grande majorité des patients pourra facilement aller vers un état d'abstinence alcoolique en préparation pour un programme de réhabilitation de longue durée [47].

Pour les patients dépendants de l'héroïne et autres opioïdes, la détoxification médicalement assistée est utile seulement pour préparer l'état d'abstinence à long terme ou la réhabilitation maintenue par les antagonistes opioïdes [348]. Puisque la majorité des patients inclus dans les programmes de sevrage rechutent rapidement, la détoxification, même supportée par les systèmes publics et privés d'assurance maladie, est souvent inutile [300,438]. La détoxification n'est pas applicable aux patients qui dépendent des opioïdes et qui préfèrent se maintenir par la méthadone ou un autre agoniste opioïde [243]. Les thérapies de groupe sont efficaces pour des patients sélectionnés, sont chères et de moins en moins disponibles [144].

Le syndrome de retrait des opioïdes, même inconfortable, n'est pas menaçant toute une vie, et peut facilement être traité par une diminution graduelle de la dose d'un opioïde de durée d'action longue comme la méthadone [300,438]. Quand pour des raisons de restriction légales, la méthadone n'est pas disponible pour la détoxification, les médicaments utiles sont ceux qui suppriment l'activité adrénergique centrale [300,438]. Ces derniers ont été développés chez le modèle animal de retrait des opioïdes. Ces études ont montré que les agonistes  $\alpha$ -2 qui agissent sur les auto-récepteurs produisent une inhibition pré-synaptique de l'activité du locus coeruleus effective pour réduire la composante adrénergique majeure du syndrome de retrait des opioïdes [149]. Par conséquent, la clonidine [149] et la lofexidine [21] ont trouvé une place dans le traitement des symptômes de retrait des opioïdes. Le syndrome de retrait des stimulants comme la cocaïne ou l'amphétamine

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

consiste en symptômes de fatigue et dépressifs qui généralement se résolvent au cours de quelques jours et n'ont pas besoin de médicaments [348].

Comme désordre chronique, l'addiction nécessite un traitement de longue durée qui est généralement mesuré en mois et en années. Les médicaments qui ont montré une efficacité, en association avec les traitements du comportement, dans la prévention de la rechute sont classés en agonistes, combinaisons d'agonistes et antagonistes et anti-besoin.

### **D- V- 2- LES MÉDICAMENTS AGONISTES**

L'année 1960, date à laquelle l'utilité de la méthadone dans le traitement de la dépendance à l'héroïne a été démontrée est une étape cruciale dans la voie du traitement médical des addictions [109]. La méthadone est un agoniste des récepteurs  $\mu$  opioïde, lent et de longue durée d'action, qui réduit le besoin en héroïne et prévient ses effets de renforcement ou euphoriques si le patient « oublie » et prend une dose d'opioïde [109]. Le mécanisme de prévention de l'euphorie est appelé tolérance croisée. Il est basé sur le principe que la tolérance « insensibilité » acquise pour un produit d'une certaine catégorie invite à la tolérance pour tous les produits de cette catégorie. En fait, la dose de méthadone doit être ajustée à la pureté de l'héroïne que prenait le patient. Une dose d'héroïne significativement plus forte en opioïde équivalent que la dose de maintenance en méthadone va surpasser l'effet de tolérance croisée [109]. Sur la base d'une dose bien ajustée de méthadone, les patients peuvent être maintenus plusieurs années [16]. Le besoin en opioïdes est diminué ou absent, et les patients sont capables de s'engager dans des activités constructives [109]. La cognition et la vigilance ne sont pas affectées, et le fonctionnement dans des tests complexes incluant les études supérieures peut être accompli [437]. Actuellement, plus de 115000 anciens

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

dépendant à l'héroïne sont maintenus par la méthadone. Ceux qui ont des problèmes psychologiques significatifs nécessitent des conseils ou une psychothérapie en plus du médicament. Un agoniste nouveau disponible qui peut être utilisé pour le maintien est le levo-alpha acetyl methadyl (LAAM). Cette drogue a des métabolites actifs à long terme qui bloquent les symptômes de retrait et le besoin pendant plus de 72 heures et n'a besoin d'être prise que deux à trois fois par semaine. Un autre nouveau médicament, buprenorphine est un agoniste partiel des récepteurs  $\mu$  et un antagoniste des récepteurs  $\kappa$ . Comme agoniste partiel, il produit des effets opioïdes limités et par conséquent l'overdose est rare. Par son affinité pour le récepteur  $\mu$ , il empêche l'effet des autres opiacés et opioïdes, et donc réduit l'usage de l'héroïne. Les patients traités avec le buprenorphine deviennent dépendants à ce médicament comme c'est le cas pour la méthadone et LAAM, mais le symptôme de retrait du buprenorphine est très léger.

### **D- V- 3- LES MÉDICAMENTS ANTAGONISTES**

La connaissance de l'interaction des opioïdes avec les récepteurs aux opioïdes pour produire leurs effets pharmacologiques a permis le développement des antagonistes spécifiques qui ont une forte affinité pour le récepteur mais n'activent pas la chaîne des événements cellulaires qui produisent les effets des opioïdes [410]. La naltrexone est un antagoniste avec une forte affinité pour le type  $\mu$  et moins d'affinité pour le type  $\delta$  et  $\kappa$  [406]. Au contraire de la méthadone, elle n'a pas d'activité agoniste, et donc pas d'effets calmants ou subjectifs [410]. Quand elle a été introduite la première fois, on a pensé qu'elle était un médicament idéal pour la dépendance à l'héroïne, par l'occupation des récepteurs opioïdes et le blocage des effets de l'injection de l'héroïne. Les expériences ont montré que les dépendants à l'héroïne, préfèrent la méthadone pour ses effets légers de renforcement de l'héroïne, absents avec la naltrexone. La naltrexone n'a été utilisée que très peu

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

chez les « collier blanc » dépendant aux opioïdes, comme les médecins, les infirmières et les anciens dépendants libérés de prison sous conditions [81]. Moins de 10 % de ceux qui ont reçu cette drogue ressentent la nausée et la dysphorie [534]. Même si le blocage à long terme des récepteurs opioïdes est suspecté altérer les fonctions neuroendocrines, on a noté peu d'effets même chez les patients qui ont reçu la naltrexone tous les jours pendant des années [348]. Il y'a des raisons de croire que la libération lente d'une préparation injectable de naltrexone serait meilleure parce qu'elle permet une administration mensuelle, évitant les difficultés liées à la conformité qui sont inhérentes à l'ingestion orale du médicament [242].

### **D- V- 4- LES COMBINAISONS AGONISTES ET ANTAGONISTES**

Une combinaison intéressante qui a montré son efficacité en phase clinique est la combinaison de nicotine et de mécamylamine pour la prévention de la rechute lors du sevrage tabagique. Il a été proposé que la stimulation du récepteur par l'agoniste et l'antagoniste en même temps serait plus efficace et les effets secondaires des deux drogues s'opposeraient mutuellement [431]. Cette hypothèse a été supportée par les données cliniques, mais le mécanisme est inconnu et les études sont requises dans ce domaine.

### **D- V- 5- LES MÉDICAMENTS ANTI-BESOIN**

Le concept de besoin de la drogue a été critiqué parce qu'il est un phénomène subjectif qui a plusieurs sens suivant le contexte. Le besoin peut être induit par des stimuli associés auparavant avec la prise ou les effets de la drogue, mais ces stimuli peuvent ou non amener à la consommation de la drogue [111]. Récemment, la FDA (Food and Drug Administration) a approuvé



## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

l'antidépresseur bupropion comme médicament qui réduit le besoin de nicotine et aide dans la prévention de la rechute même en absence de symptômes de dépression. Le mécanisme d'action est inconnu, mais les résultats en double-aveugle sont cliniquement significatifs avec une baisse du besoin de nicotine et une augmentation du nombre des abstinents. Une médication à base de timbre à la nicotine pour bloquer le syndrome de retrait lors de la détoxification est suivie par le bupropion pour réduire le besoin de nicotine et maintenir l'état sans nicotine.

Une médication a également reçu l'approbation du FDA pour la prévention de la rechute pour les alcooliques. Les études en double-aveugle ont montré la réduction du besoin d'alcool et de rechute chez les alcooliques détoxiqués et traités à la naltrexone [352,534]. Comment un antagoniste des récepteurs opioïdes est devenu utile dans le traitement de l'alcoolisme est tributaire des expérimentations animales sur la recherche du traitement des addictions. Au début des années 1980, le blocage des récepteurs opioïdes a montré une baisse de la préférence pour l'alcool chez les primates non humains et les rongeurs [11]. Ces résultats ont amené Volpicelli et ses collègues à tester la naltrexone chez l'homme [534]. Actuellement les études ont montré que l'alcool produit moins de récompense lorsque les récepteurs opioïdes sont bloqués, probablement parce que l'alcool active le système opioïde endogène [221]. Ce médicament est utilisé comme adjuvant depuis 1997 pour réhabiliter une minorité d'alcooliques mais son efficacité est de plus en plus reconnue, ainsi le nombre d'alcoolique bénéficiant de ce traitement a dépassé celui des dépendants à l'héroïne, à l'origine de son développement. Le nalmefene, un autre antagoniste de longue durée des récepteurs opioïdes, utilisé dans le traitement de l'overdose par les opioïdes, a également été montré capable de réduire la rechute de l'alcoolisme [297].

L'utilité de la naltrexone dans l'alcoolisme a été découverte en Amérique du nord [534] et plusieurs pays Européens ont adopté très vite son utilisation. L'acamprosate est un médicament différent qui réduit le besoin de l'alcool. Il a été développé en Europe et il est à peine entré en phase

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

clinique aux USA. Ce médicament semble réduire l'hyperexcitabilité neuronale de long terme qui apparaît lors de la consommation chronique d'alcool. Les mécanismes ne sont pas clairs et peuvent inclure des altérations de l'expression des gènes codant les récepteurs aux acides aminés excitateurs. Ce médicament supprime la prise d'alcool chez le rat [40] et, comme dans le cas de la naltrexone, son activité dans le modèle animal prédit son efficacité clinique. Dans des études en double aveugle [445], l'acamprosate a augmenté l'abstinence alcoolique et a réduit la durée de la prise d'alcool si les patients dorment et consomment un peu d'alcool. Comme ce médicament n'agit pas sur le système opioïde endogène, il est prédit que ses effets seraient additifs avec ceux de la naltrexone. Les études sur les interactions de ces deux médicaments ont été planifiées.

### **D- V- 6- BLOCAGE DU METABOLISME DE L'ALCOOL**

Jusqu'à 1995, le seul médicament disponible pour le traitement de l'alcoolisme était le disulfiram. Ce médicament bloque le métabolisme de l'alcool et produit une accumulation d'acétaldéhyde, un dérivé toxique [348]. La réaction à l'acétaldéhyde est tellement déplaisante qu'elle prévient effectivement les patients de la consommation d'alcool. Cette drogue a encore une place dans la pharmacopée et les médicaments pour l'alcoolisme, mais son utilité est limitée simplement parce que les patients ne respectent pas la prescription [134]. Des techniques diverses impliquant le contrat ou la contrainte légale augmente le respect de la prescription et par là le succès du traitement [206].

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

### **D- V- 7- LA VACCINATION**

La notion de prévention de la rechute par immunisation du patient par la drogue de son désir a été d'abord examiné pour la morphine. Les singes ont été immunisés par la morphine-6-hemisuccinate-BSA. Les anticorps anti-morphine obtenus ont réduit l'auto administration de l'héroïne mais pas de la cocaïne [218]. La technique n'a jamais été testée cliniquement, probablement à cause de la mise sur le marché de la naltrexone. Récemment la technique a été appliquée à la cocaïne. Les anticorps obtenus réduisent les effets moteurs, les comportements stéréotypés chez le rat induit par la cocaïne et pas par l'amphétamine [64]. Les concentrations cérébrales de cocaïne ont également été baissées par les anticorps et dans une autre étude [128], les rats réduisent l'auto administration de cocaïne par voie intraveineuse après un transfert passif des anticorps anti-cocaïne. D'autres études comportementales chez l'animal, impliquant la relation effet dose, sont nécessaires pour résoudre certains problèmes sérieux à tester. La cocaïne est bon marché et disponible aux USA. Les patients qui veulent rechuter n'ont qu'à prendre une forte dose de cocaïne ou un autre stimulant pour tromper, épuiser l'anticorps.

### **D- VI- CONCLUSION : LE SYSTÈME MÉDICAL AUX ÉTATS UNIS ET LES ADDICTIONS**

L'efficacité des approches d'un traitement spécifique des addictions est étonnamment bonne, et comparable aux résultats obtenus pour d'autres maladies chroniques comme le diabète et l'asthme [350]. Les études contrôlées sur l'efficacité sont conduites dans des institutions académiques et peuvent ne pas refléter la rigueur moins bonne des programmes de traitement dans la communauté. Le problème des cliniciens moins bien préparés est très sérieux. Les recherches

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

fondamentales ont progressé dans la connaissance des addictions, et cela a permis l'avancement des traitements. Le challenge actuel serait de mettre ces progrès disponibles aux patients dans le besoin.

Théoriquement, le traitement des addictions devrait être la priorité du système médical. L'addiction est bien connue comme facteur étiologique important de conséquences très coûteuses comme le cancer, la détérioration du foie, les maladies cardiaques, les accidents et la violence pour nommer que quelques-uns. Plusieurs études ont montré que pour chaque \$1 investi dans le traitement des addictions, il y a un gain net de \$4 à \$12 [145] suivant le type de la drogue et le type de traitement. Malheureusement, le bénéfice de ces investissements à un effet à longue durée, et les programmes de politique sanitaire, orientés dans notre monde par les profits, semblent viser des buts à courts termes. Aux USA, les fonds pour le traitement des addictions ont été réduits sérieusement, aussi bien dans les programmes des secteurs publics que privés. Quand les fonds sont disponibles, ils ont tendance à être utilisés dans des traitements brefs des addictions plutôt que dans des soins de longue durée, donc sans tenir en compte du caractère chronique de la rechute [350]. À cause des niveaux bas de remboursement des soins, les cliniciens bienveillants ont tendance à se faire payer moins cher et non aux tarifs professionnels. Même si le niveau des complications chez ces patients est généralement très élevé, avec des problèmes de poly dépendance et de déséquilibres psychiatriques, les premiers thérapeutes n'ont pas de formation adéquate à l'échelle de cette complexité. Même si des médecins sont consultés, leurs connaissances dans le domaine de la psychopharmacologie des addictions sont fragmentaires, puisque ce programme n'est pas inclus dans le cursus universitaire. Par conséquent, il y a une tendance à moins bien utiliser les moyens de la psychopharmacologie disponibles actuellement pour améliorer le traitement des addictions.

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

### **E- ROLES DU MONOXYDE D'AZOTE (NO) DANS LES ADDICTIONS**

Le gaz radicalaire libre monoxyde d'azote (NO) joue un rôle très important dans divers processus physiologiques. Il est synthétisé à partir du précurseur L-arginine par l'enzyme NO synthase (NOS), qui transforme la L-arginine en NO et citrulline. Cette voie de synthèse existe dans le système nerveux central (SNC), où le NO semble être une molécule messager remplissant la plupart des critères d'un neurotransmetteur.

Des études récentes indiquent que le NO pourrait jouer un rôle important dans la dépendance aux drogues telles les opioïdes, l'alcool, les psycho-stimulants et la nicotine. Les inhibiteurs de NOS diminuent certains signes de retrait des opioïdes, de l'alcool et de la nicotine.

Ces résultats suggèrent l'implication du NO dans l'expression des signes de retrait et ouvrent l'hypothèse selon laquelle le NO est un médiateur du développement de plusieurs signes de retrait. Même s'ils sont préliminaires, les résultats obtenus à ce jour suggèrent que la neurotransmission glutamatergique est probablement responsable des effets bénéfiques des inhibiteurs de NO sur les signes de retrait. De plus le NO et le dérivé peroxy-nitrite (OONO<sup>-</sup>) stimulent la libération des neuromédiateurs dans le SNC et régulent la perméabilité de la barrière hémato encéphalique.

Des données émergentes suggèrent de plus en plus un rôle beaucoup plus général pour le NO dans le potentiel d'addiction de différentes classes de drogues. Par conséquent, la modulation de la voie du NO pourrait être une cible potentielle dans les approches thérapeutiques des addictions.

# ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

## E- I- GÉNÉRALITÉS SUR LE MONOXYDE D'AZOTE

Le NO est un gaz radicalaire libre, très labile avec une durée de vie d'environ 6-10 sec avant sa conversion par l'eau et l'oxygène en nitrates et nitrites [477]. Le NO était connu depuis longtemps chez la bactérie, mais avant 1988 il n'y avait aucune évidence de ses rôles biologiques chez les vertébrés. Par la suite, le NO a été reconnu comme molécule messenger dans le SNC, remplissant certains critères des neurotransmetteurs [48,475]. Par exemple, le NO diffuse d'un neurone vers un autre, et un récepteur candidat (le fer du site catalytique de la GC (guanylate cyclase) [46]) a été identifié. Cependant, le NO est différent de la plupart des neurotransmetteurs du SNC, car il n'est pas stocké dans des vésicules synaptiques, n'est pas libéré par exocytose et n'agit pas sur des protéines réceptrices de la membrane neuronale [46,101]. Il reste à déterminer si le NO est unique ou seulement le premier d'une classe nouvelle de modulateurs neuronaux, mais il est bien établi que le NO est probablement un médiateur significatif des signes de la dépendance aux drogues d'addiction.

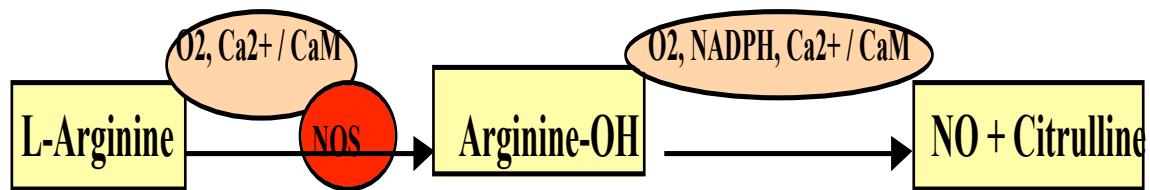


Figure 6. Biosynthèse du NO.

(Ca<sup>2+</sup>/CaM = calcium/calmoduline, NADPH = nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, NO = monoxyde d'azote, NOS = NO synthase).

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

La synthèse du NO se fait en deux étapes [46]. La première étape consiste à convertir le précurseur L-arginine en arginine hydroxylée, une réaction catalysée par la NO synthase (NOS). Dans la seconde étape, l'arginine hydroxylée est convertie en NO et en citrulline. Le calcium, la calmoduline (CaM), l'oxygène et le nicotinamide dinucléotide phosphate (NADPH) contribuent à la synthèse (Fig. 6).

L'existence de trois isoformes de NOS a été démontrée par l'isolement et le séquençage d'ADNc codant l'enzyme à partir de plusieurs sources de tissus de l'homme, des bovins, du rat et de la souris [356]. Ce sont des enzymes endothéliales ou eNOS, neuronales ou nNOS ou inducibles ou iNOS. Les isoformes eNOS et nNOS ont été trouvées à l'origine dans les cellules endothéliales et neuronales, respectivement. L'isoforme iNOS est inducible dans les macrophages et autres types de cellules en réponse aux endotoxines et/ou diverses cytokines [318,356]. Certains inhibiteurs connus de NOS et leur sélectivité qualitative, estimée in vitro, pour ces différentes NOS sont cités dans le Tableau I.

Une voie L-arginine NO existe dans le SNC [46,136,317], avec un niveau d'activité NOS différent suivant les régions du cerveau, cervelet, hippocampe, striatum, cortex, hypothalamus, cerveau moyen et medulla. Le plus haut niveau d'activité NOS se trouve dans le cervelet et le plus bas dans la medulla [127].

Le NO a été impliqué comme produit chimique nuisible au cerveau [224,476] et suggéré responsable de la toxicité neuronale des maladies d'Alzheimer, de Huntington, et dans l'ischémie cérébrale [183]. Le NO pourrait être responsable de l'altération neuronale causée par l'alcool [247] et l'ischémie cérébrale [115,346].

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau I. Sélectivité de quelques inhibiteurs de NOS. (Exception pour le 7-NI soluble dans l'huile de cacahuète, les autres inhibiteurs sont solubles dans l'eau).

Produit	Abréviation <sup>a</sup>	Potentiel inhibiteur <sup>a</sup>
N <sup>G</sup> -monométhyl-L-arginine	L-NMMA	nNOS = eNOS > iNOS
N <sup>G</sup> -nitro-L-arginine	L-NA	nNOS = eNOS >> iNOS
N <sup>G</sup> -amino-L-arginine	L-NAA	nNOS = iNOS > eNOS
L- N <sup>G</sup> -nitro-arginine	L-NNA	Pas d'information
7-nitroindazole <sup>b</sup>	7-NI	nNOS = eNOS = iNOS
L- N <sup>G</sup> -nitro-arginine-méthyl ester	L-NAME	Pas d'information
N <sup>d</sup> iminoéthyl-L-ornithine	L-NIO	iNOS > eNOS = nNOS
Aminoguanidine	Pas d'abréviation	iNOS > eNOS = iNOS
Agmatine <sup>c</sup>	Pas d'abréviation	Pas d'information

<sup>a</sup>, abréviation [318]. <sup>b</sup>, bien qu'il ne soit pas sélectif pour les enzymes isolées, il montre une sélectivité apparente pour nNOS [318,321]; <sup>c</sup>, dérivé actif de l'arginine [274] et se fixe avec une forte affinité sur tous les sous types de récepteurs imidazoline et  $\alpha_2$  adrénergiques [409].

Récemment, des études ont montré que l'agmatine inhibe la NOS sur des préparations d'aorte de lapin [15] et dans le cerveau de rat [135].

De plus, le NO a été impliqué dans d'autres fonctions cérébrales, comme la perception de la douleur [321,322], l'apprentissage et la mémorisation [556], l'anxiété [400], la crise [203], les comportements de prise d'aliments [328], de boisson [58] et la libération et la capture des neurotransmetteurs [357]. Ces observations ont toutes été obtenues avec les inhibiteurs de NOS et suggèrent un rôle pour le NO dans ces mécanismes. Par conséquent, le rôle critique du NO dans les réponses du SNC à une variété de stimulus semble évident. Des études récentes suggèrent que le



## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

NO joue un rôle dans le développement de la dépendance physique aux substances d'addiction comme l'alcool et les opioïdes.

### **E- II- LIBÉRATION DES NEUROTRANSMETTEURS ET LE NO**

Le NO et son dérivé le peroxy-nitrite stimulent la libération des neurotransmetteurs du SNC. Les donneurs de NO testés actuellement stimulent la libération de plusieurs neurotransmetteurs (Tableau II).

Les antagonistes de NOS inhibent la libération des neurotransmetteurs comme l'acétylcholine (Tableau III), la dopamine (Tableau IV), la noradrénaline (Tableau V) et les aminoacides neuronaux GABA, glutamate et taurine (Tableau VI). Les mécanismes par lesquels le NO et le OONO<sup>-</sup> stimulent la libération des neurotransmetteurs sont controversés. Les résultats obtenus dans ce domaine permettent de proposer une présentation schématique (Fig. 7) et de tirer les conclusions suivantes :

Le NO et le OONO<sup>-</sup> agissent sur la face externe des membranes des cellules car les inhibiteurs qui traversent difficilement les membranes comme l'hémoglobine sont capable de diminuer les effets du donneur de NO, comme le NMDA [319,361,366] et le RBS [487] sur la libération des neurotransmetteurs.

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau II. Stimulation des neurotransmetteurs par des donneurs de NOS. (Abréviations : N, noradrénaline ; D, dopamine ; A, acétylcholine ; GABA, acide gamma amino butyrique ; Glu, glutamate ; T, taurine)

Produit	Abréviation	Neurotransmetteur
Monoxyde d'azote	NO (gaz)	N
Isosorbide dinitrate	ISDN	D
Roussin's black salt	RBS	D
3-morpholino-sydnonimine	SIN-1	A, N, GABA, Glu
Sodium nitroprusside	SNP	A, D, N, GABA, Glu, T
S-nitroso-N-acetylpenicillamine	SNAP	A, N, GABA, Glu, T
S-nitrosoglutathione	SNOG	A, GABA, Glu, T
N-methyl-D-aspartate	NMDA	A, D, N, GABA
Hydroxylamine	Pas d'abréviation	A, D, N
L-arginine	Pas d'abréviation	D

L'implication du GMPc est moins spécifique du fait de ses actions multiples : modulation des canaux  $Ca^{2+}$  et  $Na^{+}$ , actions sur les kinases et les phosphodiésterases GMPc-dépendantes [137].

Les résultats obtenus avec les inhibiteurs de la GC comme le bleu de méthylène et LY83583 sont généralement favorables à la contribution du GMPc à la libération des neurotransmetteurs induite par le NO [271]. Cependant, les travaux avec zaprinast, un inhibiteur de la phosphodiésterase, [487] et les analogues de GMPc comme le 8-bromo-GMPc [493] n'ont pas confirmé le rôle du GMPc dans les effets du NO. Ainsi, le rôle du GMPc dans les effets du NO sur la libération des neurotransmetteurs reste encore à démontrer.

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

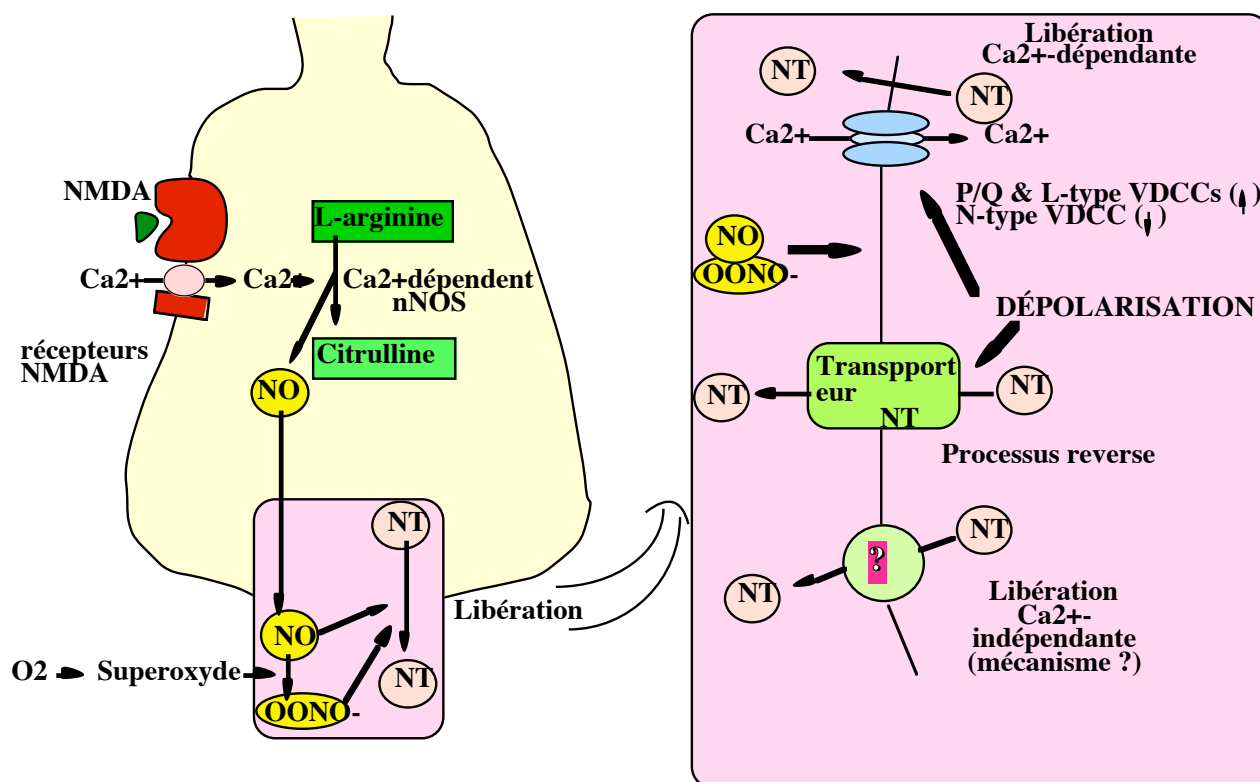


Figure 7. Présentation schématique de la libération des neurotransmetteurs induite par le NO et le  $OONO^-$ . Abréviations : NT, neurotransmetteur

Le rôle général du  $Ca^{2+}$  dans la libération des neurotransmetteurs s'applique aussi aux effets du NO [271,360,493]. La libération des neurotransmetteurs évoquée par la dépolarisation de la membrane fait intervenir un mécanisme dépendant du  $Ca^{2+}$  et un mécanisme indépendant du  $Ca^{2+}$  mais dépendant du  $Na^+$ . Ce dernier mécanisme est un processus reverse  $Na^+$  dépendant de capture des neurotransmetteurs via les transporteurs (Fig. 7) [262]. Ces deux mécanismes sont opérationnels pour la libération du GABA [360] mais pour la libération de la dopamine, le mécanisme  $Ca^{2+}$  indépendant ne semble pas être lié au processus reverse de capture de la dopamine car la nomifensine, un inhibiteur de la capture de la dopamine, n'a pas d'effet sur la

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

libération induite par le NO en présence du chélateur de  $\text{Ca}^{2+}$  perméable le BAPTA-AM (1,2-bis(o-aminophenoxy)-ethane) [487]. Il est donc possible que pour la libération de la dopamine, le NO agisse par altération des réactions de contact et de fusion des vésicules de stockage suite aux interactions entre les protéines synaptiques (VAMP2 et SNAP-25) et membranaire comme la syntaxine. Un tel mécanisme de libération indépendant du  $\text{Ca}^{2+}$  a été proposé dans le cas de la libération du glutamate par le NO [307,308]. De plus, le NO par S-nitrosylation et ADP-ribosylation des protéines intracellulaires [49,482] peut modifier la machinerie de l'exocytose. Ainsi, la nature exacte des mécanismes  $\text{Ca}^{2+}$  indépendants impliqués dans la libération par le NO des neurotransmetteurs reste à élucider.

Pour le mécanisme  $\text{Ca}^{2+}$  dépendant, l'effet du NO sur la libération des neurotransmetteurs fait intervenir la dépolarisation de la membrane par le NO et l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule, car la tétrodotoxine (TTX) inhibe l'effet du NO [389]. Le mécanisme de la dépolarisation de la membrane par le NO reste à déterminer. Dans le cas où l'effet du NO sur la libération des neurotransmetteurs est dépendant du GMPc, l'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  peut se faire par les canaux calciques dépendants du GMPc [137]. Quatre types de canaux calciques voltage dépendant ou VDCCs (type P/Q, N et L) sont exprimés par les neurones [327]. La TTX inhibe les effets du NO sur l'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  dans les neurones via une inhibition des VDCCs de type N indépendante de GMPc [365]. Ces données permettent de proposer que le NO dépolarise la membrane et ouvre les VDCCs à l'exception des types N qui sont inhibés. Ces mécanismes participeraient à la libération des neurotransmetteurs  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante par le NO. On peut noter que les travaux montrent que le NO peut aussi bien stimuler la libération basale ou inhiber la libération stimulée électriquement [37] ou par de fortes concentrations de  $\text{K}^{+}$  [493]. L'inhibition des VDCCs de type N pourrait expliquer les effets inhibiteurs du NO sur la libération des neuromédiateurs [365].

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

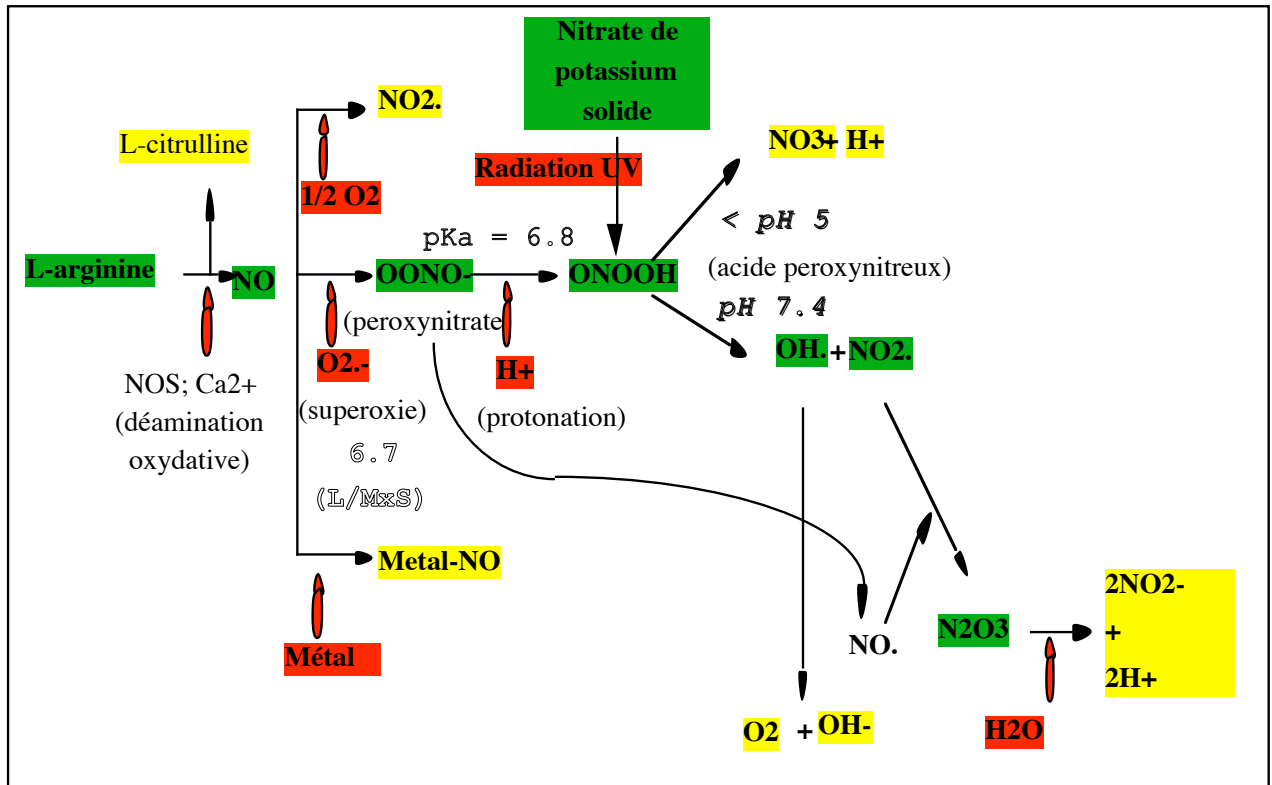


Figure 8. Devenir du NO et du OONO<sup>-</sup>.

### E- III- PARTICIPATION DU PEROXYNITRITE (OONO<sup>-</sup>) ET SES INTERACTIONS AVEC LE NO

Le peroxynitrite se forme lors de la réaction du NO avec le superoxyde O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Le peroxynitrite a des propriétés oxydantes et intervient dans un ensemble de processus physiologiques et pathologiques [23]. Suivant les conditions du milieu biologique, les réactions et les interactions entre le NO et le peroxynitrite sont variées (Fig. 8). Il a été montré que le peroxynitrite intervient dans les mécanismes de libération des neurotransmetteurs [361,366]. Les mécanismes Ca<sup>2+</sup> dépendant et indépendant décrits pour le NO semblent valables pour le peroxynitrite [363]. De plus, le radical hydroxyle (OH<sup>•</sup>) formé lors de la décomposition du NO et du OONO<sup>-</sup> semble également participer aux mécanismes de libération des neurotransmetteurs. En effet, le mannitol, l'acide

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

urique N, N'-diméthylthiourea et les autres scavengers de OH<sup>•</sup> facilitent les effets stimulateurs du NO [358,359] et du OONO<sup>-</sup> [164,174] sur la libération des neurotransmetteurs. Les mécanismes impliqués ne sont pas connus ni même les effets de l'application directe de OH<sup>•</sup>. Cependant, une étude a démontré que la facilitation est liée à une entrée plus importante de Ca<sup>2+</sup> via les VDCCs de type L [364]. Les effets du NO et du OONO<sup>-</sup> vont donc dépendre du OH<sup>•</sup> formé lors de leur propre décomposition.

### **E- IV- LA DÉPENDANCE AUX OPIOIDES ET LE NO**

Des évidences récentes sont en faveur du rôle du NO dans la dépendance physique aux opioïdes. Initialement, il avait été démontré que les inhibiteurs de NOS diminuent les signes de l'abstinence de la morphine [3,220]. Dans ces études, le pré-traitement des rats avec L-NAME et L-NNA (Tableau VII) a atténué certains signes du retrait de la morphine lorsqu'ils sont précipités par la naloxone, comme la perte de poids et les tremblements du chien mouillé. Il a également été observé que l'isosorbide dinitrate, un donneur de NO, induit les signes d'abstinence de la morphine [3]. Des travaux postérieurs ont démontré le blocage d'autres effets de l'abstinence de la morphine par les inhibiteurs de NOS [98,162,263,279,530,532]. Par exemple chez le rat dépendant à la morphine, l'agmatine un inhibiteur de NOS, réduit notablement et dose dépendant la sévérité des signes de retrait de la morphine précipités par la naloxone, comme les sursauts, le tremblement du chien mouillé, les défécations...[13]. Le 7-NI, un inhibiteur plus spécifique de NOS du cerveau in vivo [318,321], atténue d'avantage les signes de retrait des opioïdes que les autres inhibiteurs, comme le L-NAME, le L-NNA et le L-NIO [530]. Dans une étude plus récente, les mêmes auteurs ont montré que ce sont les formes eNOS et nNOS qui sont le plus impliquées dans les rôles associés au NO dans la dépendance et le retrait de la morphine [532]. Ces observations suggèrent que le NO

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

du SNC peut-être un modulateur du syndrome de retrait des opioïdes. De plus, ils permettent de penser que les inhibiteurs de NOS pourraient être utilisés comme adjuvants lors du retrait des opioïdes.

Peu d'études ont évalué les effets du NO sur le développement de la dépendance physique aux opioïdes. Le traitement par le L-NMMA inhibe les signes de retrait de la morphine précipités par la naloxone chez le rat dépendant [34]. Dans une étude récente, le traitement chronique de la souris dépendante à la morphine par la morphine augmente le nombre de cellules positives pour la nNOS dans le bulbe, les noyaux olfactifs, le cervelet, le locus coeruleus, la medulla oblongata, et le baisse dans l'hypothalamus [94]. L'induction de l'abstinence par administration de la naloxone aux souris dépendant à la morphine, augmente l'immunoréactivité de la nNOS dans l'hypothalamus et le locus coeruleus. Ces observations indiquent que le NO peut avoir un rôle important dans le développement de la dépendance physique et dans l'expression du syndrome de retrait des opioïdes [498].

Les inhibiteurs de NOS sont aussi capables de prévenir ou de diminuer le développement de la tolérance aux opioïdes [173,279]. L-NAME ou L-NA bloque le développement de tolérance aux effets analgésiques de la morphine pendant au moins 7 jours [279].

On peut conclure que le NO peut avoir un rôle dans le développement de la tolérance à la morphine. Cette conclusion est obtenue par la mesure de l'activité extracellulaire des neurones du locus coeruleus de coupes de cerveau que L-NA a atténué [173].

Cependant, d'autres études n'ont pas atteint la même conclusion. Par exemple, l'administration de L-NAME ou L-NMMA avec la morphine accélère, plutôt qu'inhibe le développement de la tolérance aux effets analgésiques de la morphine [98]. Mais lorsque la tolérance a été développée à la morphine seule, ces mêmes auteurs ont observé que ces antagonistes réduisent son développement et les signes de la dépendance. Ils ont également montré que la L-

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

arginine, un donneur de NO, retarde le développement de la tolérance aux opioïdes, mais que la L-arginine est sans effet si la morphine a été donnée seule. Par des méthodes d'hybridation in situ et d'immunohistochimie, on observe que l'administration répétée de la morphine pendant 10 jours augmente l'ARNm de NOS dans la moelle épinière [277]. Cet effet était aussi accompagné par une augmentation du nombre de cellules immunoréactives (et de la densité optique de la réaction). On peut conclure que l'administration répétée de la morphine augmente la biosynthèse de NOS dans la moelle épinière et reflète un changement adaptatif contribuant au développement de la tolérance et de la dépendance aux opioïdes. Ces résultats sont en accord avec l'implication de la voie du NO dans l'adaptation des neurones, le développement de la tolérance et de la dépendance physique qui suivent l'administration chronique des opioïdes. Concernant l'effet analgésique des opioïdes, les données sont moins certaines et les études devraient être poursuivies.

On ne sait pas encore quelle région du cerveau est importante pour obtenir avec les inhibiteurs NOS la réduction des signes de retrait des opioïdes. La micro injection de ces inhibiteurs dans différentes régions cérébrales permettra de déterminer où l'action est prépondérante pour la dépendance aux opioïdes. Au niveau des mécanismes moléculaires, les preuves s'accumulent sur l'interaction du NO avec la neurotransmission glutamatergique. L'activation par le glutamate des récepteurs aux acides aminés excitateurs, particulièrement le sous-type NMDA (N-méthyl-D-aspartate) entraîne l'entrée de  $Ca^{2+}$  dans les neurones et l'activation des NOS dépendante du calcium et de la calmoduline [138].

Cette activation des récepteurs NMDA est accompagnée par une augmentation de la formation de NO [136] et sa libération. Le NO diffuse jusqu'au neurone présynaptique et augmente l'activité de la GC et les concentrations de GMPc [291] (Fig. 9).

Le rôle et l'importance de l'activation des récepteurs NMDA et des acides aminés excitateurs dans le développement de la dépendance physique aux opioïdes est bien connu



## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

[509,510]. Par exemple, les antagonistes NMDA inhibent les signes de retrait des opioïdes chez le rat [172,241,509] et la souris [59,152,388]. À la lumière de ces données, la modulation des signes de retrait des opioïdes par le NMDA implique en partie l'activation de la synthèse du NO.

### **E- V- LA DÉPENDANCE À L'ALCOOL ET LE NO**

L'administration aiguë ou chronique d'éthanol inhibe la synthèse du NO dans les tissus périphériques [225] et réduit l'élimination du NO dans l'air expiré [378]. Tenant compte de ces observations, on peut suggérer que l'inhibition par l'éthanol de la voie arginine-NOS-NO dans le cerveau est responsable d'une partie des effets sédatifs et hypnotiques de l'alcool [4]. Si cette hypothèse était correcte, l'inhibition de NOS devrait augmenter et la formation du NO diminuer les effets de l'alcool. Ces auteurs ont observé que L-NAME augmente la narcose de l'éthanol, alors que l'isosorbide dinitrate, un donneur de NO, la diminue [4]. En accord avec cette hypothèse, l'administration de 7-NI (20 mg/kg), un inhibiteur sélectif de nNOS, 30 minutes avant l'administration de l'éthanol (4 g/kg, ip) augmente le temps de sommeil induit par l'éthanol chez le rat [529]. La co-administration de 7-NI (40-120 mg/kg) avec une dose sub-hypnotique (2 g/kg) d'éthanol produit un effet hypnotique chez ces animaux.

Cependant, ces résultats [529] ne montrent pas de façon claire que la baisse de production de NO augmente l'effet de l'éthanol. L'effet du 7-NI a été attribué à des considérations pharmacocinétiques. En effet chez les rats traités au 7-NI, la concentration d'éthanol baisse plus lentement que chez les rats témoins. Cependant, le 7-NI (6 mg/kg) augmente les effets anxiolytiques d'une concentration sub-effective (1 g/kg, ip) et effective (1,2 g/kg, ip) d'éthanol chez le rat dans le test Plus Maze [122].

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

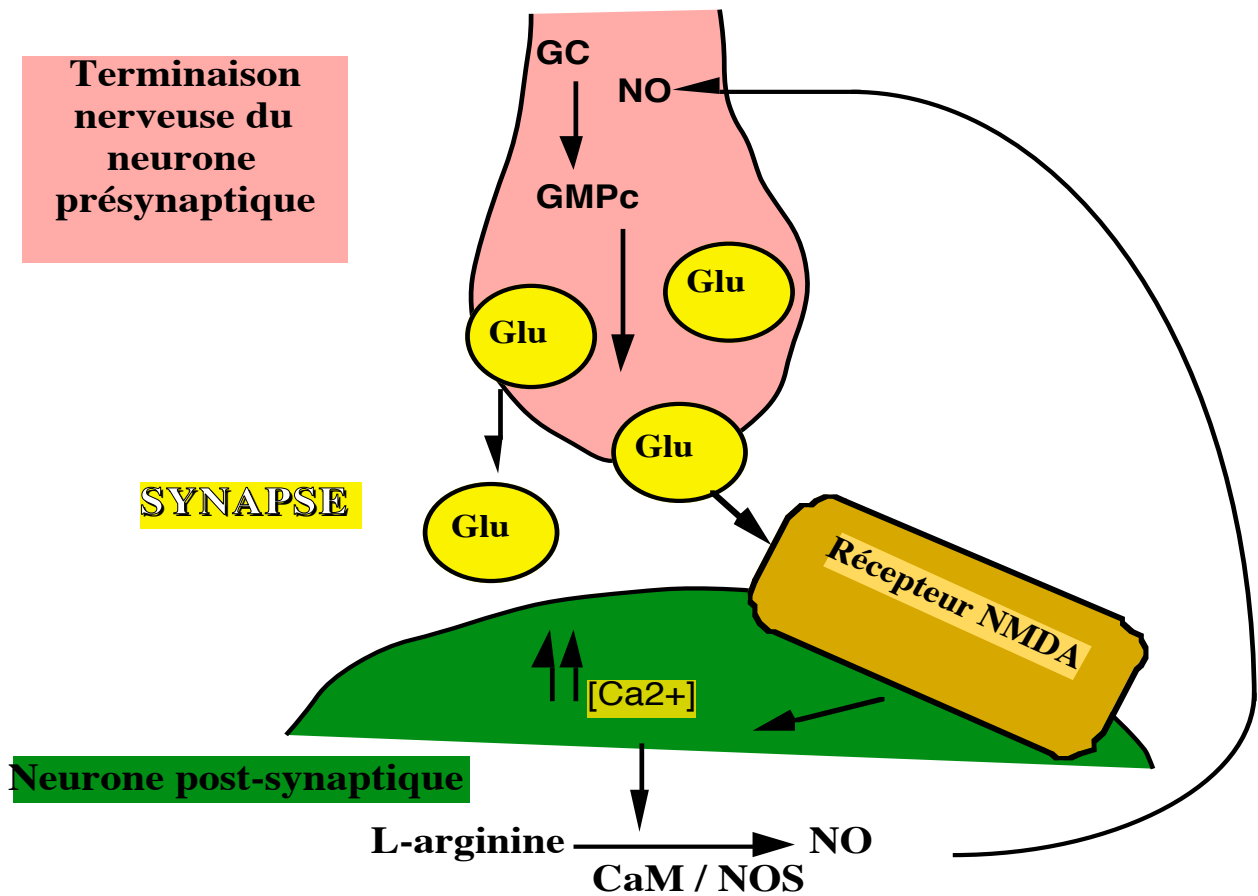


Figure 9. Modèle de fonctionnement de la voie du NO dans le SNC. La libération du glutamate (Glu) du neurone pré-synaptique agit sur les récepteurs NMDA du neurone post-synaptique et augmente le Ca<sup>2+</sup> intracellulaire. Le Ca<sup>2+</sup> avec la calmoduline active la NOS. Le NO produit diffuse jusqu'au neurone pré-synaptique où il augmente l'activité de la GC et les concentrations de GMPc qui stimule la libération du glutamate.

Les effets du 7-NI dans cette étude ne pouvaient être attribués à des effets pharmacocinétiques, car le 7-NI à des doses inférieures à 20 mg/kg n'a pas d'effet sur la clearance de l'éthanol chez le rat [529]. Certainement, l'explication simpliste de l'ensemble de ces observations est que l'inhibition des voies dépendantes du NO augmente l'efficacité hypnotique et

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

anxiolytique de l'éthanol. Est-ce que l'inhibition de NOS augmenterait l'efficacité de renforcement de l'éthanol ? Plusieurs auteurs ont étudié l'effet des inhibiteurs de NOS sur la préférence et la consommation de l'éthanol. Le L-NNA, un inhibiteur de NOS, co-administré avec l'éthanol (chroniquement) réduit la préférence de l'éthanol chez le rat après 40 jours de traitement ; au contraire, L-NNA ne produit aucun effet sur la préférence lorsqu'il est administré seul [246]. L'inhibition de NOS atténue la consommation d'éthanol chez le rat préférant l'éthanol [411]. De plus, l'inhibition de NOS, particulièrement par le 7-NI, diminue les réponses renforcées par l'éthanol et par la saccharine [524], en accord avec les études suggérant que les inhibiteurs de NOS diminuent l'alimentation chez les rongeurs [328,481]. Il semble donc prématuré de conclure que les inhibiteurs de NOS modulent sélectivement la consommation de l'éthanol via des mécanismes centraux spécifiques aux effets de renforcement.

Les études ne montrent pas toutes que les inhibiteurs NO augmentent les effets de l'éthanol. L'inhibition de NOS bloque la sensibilisation motrice de l'éthanol chez la souris [194]. Dans leur étude, l'administration d'éthanol (1,5 g/kg, ip) pendant 7 jours a augmenté progressivement l'effet stimulant moteur de l'éthanol. Le pré-traitement par le 7-NI (25 mg/kg) a bloqué l'expression de cette hypersensibilité motrice. Une dose d'éthanol administrée 1 et 4 semaines après le retrait a montré que l'effet sensibilisant de l'éthanol est de longue durée et que la co-administration de 7-NI et de l'éthanol atténue cette sensibilisation [194]. Dans cette même étude, le pré traitement par le 7-NI (25 mg/kg) a également bloqué complètement l'effet CPP de l'éthanol, et le 7-NI seul n'a aucun effet de récompense ni d'aversion [194]. Dans d'autres études, le L-NAME (10-540 mg/kg) et le 7-NI (10-80 mg/kg), inhibiteur NO non sélectif et inhibiteur spécifique NOS centrale, respectivement, ne se substituent pas à l'éthanol chez le rat entraîné à utiliser l'éthanol comme stimulus discriminatif [237]. De plus, le précurseur du NO L-arginine (100-500 mg/kg) ne s'est ni substitué ni n'a bloqué l'effet stimulus de l'éthanol [237]. Enfin, l'éthanol jusqu'à 200 mM, ne modifie ni

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

l'activité de NOS dans les préparations homogènes du cervelet ni la production de NO dans les cellules granulaires en culture du cervelet de souris [191]. L'activité NOS dans différentes régions cérébrales de la souris, comme le cortex frontal, le striatum, l'hippocampe et le cervelet n'a également pas été modifiée par l'administration aiguë (3 g/kg) ou chronique (3,3 g/kg ; 3,5 jours) d'éthanol. Les auteurs ont suggéré que la nNOS était résistante à l'éthanol et que celui-ci affecte la voie NO dans le cerveau via un mécanisme différent de la nNOS [191]. Par conséquent, les résultats sont conflictuels et d'autres études contrôlées sont nécessaires avant de pouvoir conclure sur le rôle de l'inhibition de NO et NOS dans les effets aigus de l'éthanol.

L'inhibiteur L-NA de NOS bloque le développement de la tolérance rapide à l'éthanol dans le test du plan incliné. De plus, le L-NA n'a aucun effet par lui-même sur cette incoordination et n'augmente pas celle de l'éthanol. Par conséquent l'inhibition de la tolérance rapide à l'éthanol ne peut être attribuée à des effets directs de L-NA sur la performance motrice. Ce travail suggère donc un effet du NO sur le développement de la tolérance rapide à l'éthanol chez le rat [215].

Les signes comportementaux de retrait de l'éthanol, comme l'hyperactivité, le tremblement et la rigidité ont été inhibés par le L-NAME, un inhibiteur de NO, et augmentés par l'isosorbide dinitrate, un donneur de NO [5]. Ces auteurs ont proposé que le NO soit un médiateur de certains effets du retrait de l'éthanol [5]. Cette hypothèse a été confirmée par d'autres travaux sur les effets des inhibiteurs de NOS sur le syndrome de retrait de l'éthanol [246,523,526]. Le L-NAME (30 et 60 mg/kg, ip), un inhibiteur non sélectif de NOS, et le 7-NI (40 et 80 mg/kg, ip), un inhibiteur sélectif de nNOS, ont inhibé l'hyperactivité et baissé le score du syndrome de retrait chez le rat dépendant à l'éthanol [523]. Ces observations avec L-NAME complètent les résultats obtenus avec le 7-NI et confirment les résultats d'Adams et al. [5]. Cette étude a également montré une inhibition par les inhibiteurs de NOS des effets de l'éthanol sur la crise audio génique [523], un des signes incontestables du développement de la dépendance physique à l'éthanol [329,513]. De plus, l'effet

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

inhibiteur significatif du 7-NI sur les signes de retrait de l'éthanol a été évité par l'administration du précurseur de NO, L-arginine. Ceci suggère que l'effet passe par la NOS, car l'excès de L-arginine déplace le 7-NI de l'enzyme.

En résumé, les données concernant le rôle exact du NO dans la modulation des effets aigus et chroniques de l'éthanol sont contradictoires et, par conséquent, difficiles à interpréter. Au contraire, les données concernant les inhibiteurs de NOS et le retrait de l'éthanol sont en accord et montrent que l'inhibition de NOS bloque le syndrome de retrait de l'éthanol chez les rongeurs.

Comment les inhibiteurs de NOS améliorent le retrait de l'éthanol ? Une possibilité serait que le NO cause une augmentation de l'entrée de  $Ca^{2+}$  dans le neurone comme conséquence de la stimulation de la libération de glutamate, qui va stimuler les récepteurs NMDA. Comme pour la dépendance aux opioïdes, la stimulation des récepteurs NMDA produit une entrée de  $Ca^{2+}$  dans le neurone et active la NOS [138] et la formation de NO [136] (Fig. 7). L'hypothèse que le NO est responsable des effets neurotoxiques de l'éthanol via l'activation excessive des récepteurs aux acides aminés excitateurs a été proposée [247]. Des études récentes ont montré clairement le rôle de la stimulation des récepteurs aux acides aminés excitateurs dans le développement de la dépendance alcoolique [100,165,238,434,503,514]. De plus, le blocage des récepteurs NMDA réduit énormément les signes de retrait de l'éthanol, particulièrement les crises chez le rat [99,119,329,502] et la souris [153,267]. L'étude de l'effet de l'exposition prolongée à l'éthanol sur la sensibilité des récepteurs des acides aminés excitateurs et la formation de NO dans des cultures primaires de neurones corticales a montré que ce traitement potentialise la stimulation subséquente de la formation de NO en absence d'éthanol. Cette augmentation n'a été observée que pour la formation de NO couplée aux récepteurs NMDA [68].

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

En résumé, ces études suggèrent que la sur-activation de la voie de signalisation du NO qui dépend des récepteurs NMDA, par l'exposition chronique à l'éthanol, contribue à la dépendance, aux signes de retrait et aux altérations cérébrales associées à l'alcoolisme.

Un mécanisme additionnel pour les effets des inhibiteurs de NOS sur les signes de retrait de l'éthanol pourrait être l'interaction de NO avec le système dopaminergique. Les altérations du système dopaminergique central sont liées à la dépendance physique et aux signes de retrait de l'éthanol [39,232,234,442,522,525,539]. De plus, la bromocriptine, un agoniste dopaminergique, a bien été utilisée pour traiter le syndrome de retrait de l'éthanol [43,470,561]. Le NO pourrait être important dans ces effets parce que cette molécule module les activités du système dopaminergique central. L'application de NO exogène stimule la libération de dopamine endogène des coupes de striatum, et cet effet est bloqué par les inhibiteurs de NOS [163,566]. Cependant, toutes les études ne supportent pas la conclusion que l'augmentation de NO stimule la transmission dopaminergique. Le contenu en DOPAC striatal (acide 3,4-dihydroxyphenylacétique), un métabolite de la dopamine, était significativement plus élevé chez le rat traité par le L-NAME [556]. Donc, l'inhibition de NOS pourrait altérer le turn-over de la dopamine centrale qui pourrait être relié à la dépendance à l'alcool mais d'un autre côté, les preuves expérimentales manquent encore pour proposer fortement cette hypothèse.

### **E- VI- LA DÉPENDANCE AUX PSYCHOSTIMULANTS ET LE NO**

Les drogues ayant des propriétés psycho-stimulantes produisent généralement une addiction [548]. De nombreux auteurs ont suggéré que les effets stimulateurs moteurs de l'amphétamine, de la cocaïne et d'autres psycho-stimulants pourraient être liés à des effets sur la récompense. L'abus de ces substances est en premier lieu le résultat de leurs effets sur la récompense ou l'euphorie

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

[231,232,488,552]. Plusieurs travaux indiquent que des inhibiteurs de NOS comme le L-NAME et le 7-NI ne produisent aucun effet sur l'activité motrice spontanée des souris [67,203] ou des rats [197,523]. Au contraire, les inhibiteurs NOS co-administrés avec des psycho-stimulants modifient l'action psycho-stimulante et la sensibilisation motrice. Chez les rongeurs traités avec des inhibiteurs de NOS, le développement de la sensibilité aux effets moteurs de l'amphétamine et de la cocaïne a été diminué [368,397,486]. Przewlocka et al. ont suggéré que l'inhibition de NOS par la L-NAME atténue l'effet de l'amphétamine sur le comportement stéréotypé [395]. Plusieurs travaux ont aussi indiqué que les inhibiteurs de NOS réduisent l'hyperactivité motrice induite par l'amphétamine ou la cocaïne [1,193,219,394,486]. De plus, l'activité motrice de l'amphétamine ou de la cocaïne est potentialisée par la molsidomine, un donneur de NO [394]. Dans une étude récente, l'inhibiteur de NOS L-NAME a réduit significativement l'activité motrice de l'amphétamine chez le rat et cette activité de L-NAME a été bloquée par le donneur de NO L-arginine [67]. Ces résultats indiquent que l'activité de L-NAME passe par NOS et par conséquent, toutes les données sont concordantes sur l'hypothèse que les inhibiteurs de NOS empêchent l'hyperactivité et la sensibilisation des psycho-stimulants. L'activation du système dopaminergique a été impliquée dans l'effet psycho-stimulant moteur et euphorique de l'administration de l'amphétamine et de la cocaïne [548]. Récemment, le donneur de NO molsidomine a potentialisé l'hyperactivité induite par l'amphétamine ou la cocaïne de manière dose dépendante. Au contraire, les inhibiteurs de NOS L-NAME ou 7-NI ont atténué les effets de l'amphétamine ou de la cocaïne. Les inhibiteurs de NOS ont également bloqué l'hyperactivité induite par SKF 38393, un agoniste du récepteur D1 de la dopamine, et par la bromocriptine, un agoniste du récepteur D2 de la dopamine. De plus, l'hyperactivité induite par SKF ou la bromocriptine a été potentialisée par la molsidomine [394]. Ces observations confirment fortement l'hypothèse que l'augmentation de la production de NO est un facteur critique dans l'activité motrice des stimulants centraux. Les observations avec les

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

agonistes dopaminergiques sélectifs permettront d'orienter les investigations futures sur les interactions entre la stimulation des récepteurs dopaminergiques post-synaptiques et l'augmentation de la production de NO. Les données indiquent en plus un rôle pour le NO dans le phénomène de sensibilisation à ces drogues, mais ici les données sont encore préliminaires. Comme pour la médiation par le NO des effets des opioïdes et de l'éthanol, il serait particulièrement intéressant de déterminer comment le NO altère le renforcement et la discrimination des stimulants centraux.

### **E- VII- LA DÉPENDANCE À LA NICOTINE ET LE NO**

Les études consacrées au rôle du NO dans la dépendance à la nicotine sont très limitées. Dans une étude récente chez le rat, le L-NNA a réduit la sévérité de tous les signes de l'abstinence nicotinique précipitée par la mécamylamine. L'effet inhibiteur de L-NNA a été empêché par la L-arginine, suggérant un effet spécifique de NOS [286]. L'inhibition de NOS bloque aussi les signes de l'abstinence nicotinique induite par la mécamylamine ou la naloxone, un antagoniste des opioïdes [2]. Ces résultats pourraient indiquer que le NO est un médiateur de la dépendance et de l'abstinence nicotinique. Même si les données sont très limitées, elles sont consistantes avec la prédiction que les inhibiteurs de NOS peuvent être utilisés dans les aides au sevrage tabagique.

La stimulation du récepteur nicotinique induit la libération des opioïdes endogènes [146,171,492]. Le syndrome de retrait de la nicotine et de la morphine implique plusieurs signes comportementaux communs [285,287]. Par exemple, ces signes sont potentiellement réversibles par la morphine et peuvent être précipités par la naloxone [284]. De plus, la naloxone empêche l'effet bénéfique de la nicotine dans l'abstinence nicotinique [285].

À la lumière de ces observations, on peut proposer de façon spéculative que les mêmes mécanismes sont impliqués dans la médiation de la dépendance à la nicotine et aux opioïdes. Donc,



## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

il est très important de déterminer si les inhibiteurs de NOS réduisent la sévérité de l'abstinence nicotinique par un blocage de la stimulation des récepteurs NMDA par le NO.

### **E- VIII- CONCLUSIONS**

Plusieurs facteurs ont limité la détermination du rôle du NO dans les dépendances. À l'heure actuelle, un récepteur spécifique au NO dans le cerveau reste à identifier. De plus, l'investigation sur les rôles du NO dans le cerveau est limitée par l'indisponibilité d'un antagoniste nNOS spécifique. Finalement, nous avons peu d'informations, malgré l'identification de nombreux inhibiteurs de NOS, sur la pharmacocinétique de ces inhibiteurs, leurs concentrations plasmatiques effectives et leurs effets secondaires à long terme. Certains inhibiteurs NOS comme L-NAME et L-NIO ont des effets hypertenseurs [531]. Les laboratoires pharmaceutiques montrent peu d'intérêt dans ce domaine. Ces limitations mise de côté, les résultats de plusieurs travaux suggèrent que l'activation des récepteurs NMDA cause une augmentation  $Ca^{2+}$  dépendante de l'activité de NOS et la formation de NO (Fig. 7). Ces mécanismes ont un rôle important dans le développement de la dépendance physique aux drogues d'addiction. Donc, il n'est pas surprenant que le travail expérimental à présent s'intéresse au rôle du NO dans les effets des drogues d'addiction.

Les questions à résoudre sont les suivantes. Comment le NO transmet le message spécifique et comment cela se traduit en action comportementale pour les drogues de dépendance ? Pour pouvoir répondre clairement à ces questions, des travaux sont nécessaires pour confirmer les résultats montrant la réduction des signes de retrait des substances d'addiction avec les inhibiteurs de NOS (Tableau VII). Par exemple, les études mentionnées ici montrent que les inhibiteurs de NOS bloquent plusieurs signes de retrait des opioïdes et de l'éthanol. Deux possibilités sont à considérer : premièrement, l'effet peut être entièrement indépendant de l'action moléculaire de la

## **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

substance d'addiction. Par exemple la noradrénaline bloque les signes de l'anaphylaxie sans interagir directement avec les évènements moléculaires, c'est-à-dire la réaction antigène anticorps, causant ces signes. La même considération peut s'appliquer aux inhibiteurs de NOS et à leurs effets sur les signes de retrait des drogues. Deuxièmement, il se pourrait que le retrait des drogues d'addiction se manifeste en partie parce que la production de NO est excessive. Donc la production excessive de NO durant le syndrome de retrait devrait être testé par la mesure du rapport  $\text{NO}_2/\text{NO}_3$  dans le plasma et les tissus du cerveau pour confirmer le lien entre le NO et le développement de la dépendance. Mais, les données actuelles sur l'effet des inhibiteurs de NOS sur le retrait des opioïdes, de l'éthanol, et sur l'induction de l'activité motrice par les psycho-stimulants suggèrent que le système NO du cerveau est impliqué dans ces phénomènes. Donc, il existe un besoin de travaux nouveaux sur l'évaluation de l'utilisation des inhibiteurs NOS dans les thérapeutiques des addictions.

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau III. Libération de l'acétylcholine par le NO. (**a** = libération stimulée).

Espèce	Tissu	Donneur NO	Inhibiteur	Effet	Référence
Rat	Cerveau <sup>5</sup>	SIN-1		↑	[390]
	Antérieur Basal		L-NA	↓	
Rat	Hippocampe <sup>1</sup>	Hydroxylamine		↑	[272]
Rat	Striatum <sup>4</sup>	SNP, SNAP, SNOG		↑	[156]
Rat	Striatum <sup>5</sup>	SNAP	BM et LY83583	↑	[389]
			BM et LY83583		
Rat	Cortex Cérébral <sup>2</sup>	SNP, SNAP		↑	[362]
Rat	Cortex Cérébral <sup>2</sup>	NMDA		↑	[361]
Chat	Pons <sup>4</sup>		L-NA	↓	[260,261]
Rat	Striatum <sup>4</sup>		L-NMMA	↓	<b>a</b> [483]

1- Coupe ; 2- Culture primaire ; 3-Synaptosomes ; 4-Microdialyse ; 5-Push-pull perfusion

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau IV. Libération de la dopamine par le NO. (a = libération de 5-HT stimulée).

Espèce	Tissu [Préparation]	Donneur NO	Inhibiteur	Effet	Référence
Rat	Striatum <sup>1</sup>	SNP		↑	[566]
Rat	Mesencéphalon ventral <sup>2</sup>	NMDA	Hémoglobine	↑	[163]
Rat	Striatum <sup>1</sup>	Hydroxylamine		↑	[271]
Rat	Aire optique médiale <sup>4</sup>	L-arginine		↑	<b>a</b> [273]
Rat	Striatum <sup>1</sup>	RBS		↑	[37]
Rat	Striatum <sup>4</sup>	L-arginine		↑	[490]
Chat	Noyau accumbens <sup>4</sup>	NMDA		↑	[367]
Rat	Striatum <sup>1</sup>	RBS	Hémoglobine	↑	[487]
Rat	Striatum <sup>1</sup>	L-arginine		↑	[265]

1- Coupe ; 2- Culture primaire ; 3-Synaptosomes ; 4-Microdialyse ; 5-Push-pull perfusion

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

---

Tableau V. Libération de la Noradrénaline par le NO. (**a** = libération stimulée).

Espèce	Tissu	Donneur NO	Effet	Référence
Rat	Hippocampe <sup>1</sup>	Hydroxylamine	↑	[272]
Cobaye	Cortex cérébral <sup>3</sup>	NMDA	↑	[319]
Rat	Hippocampe <sup>1</sup>	SNP, SNAP, SIN-1	<b>a</b> ↑	[250]
Rat	Hippocampe <sup>1</sup>	NO gaz	<b>a</b> ↑	[489]
Rat	Hippocampe <sup>1</sup>	SNP, SNAP	↑	[446,447]

1- Coupe ; 2- Culture primaire ; 3-Synaptosomes ; 4-Microdialyse ; 5-Push-pull perfusion

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau VI. Libération d'acides aminés neuro-actifs par le NO. (a = libération stimulée).

Espèce	Tissu	Méthode	Donneur NO	Effet	Référence
<b><u>E- GABA</u></b>					
Rat	Striatum <sup>4</sup>	Micro dialyse	SNP, SNAP, SNOG	↑	[156]
Rat	Stratum Hippocampe <sup>5</sup>	Push-pull Perfusion	SIN-1	↑	[456]
Souris	Cortex cérébral <sub>2</sub>		SNP, SNAP,	↑	[366]
Poulet	Rétine		NMDA	↑	[190]
<b><u>F- GLUTAMATE</u></b>					
Rat	Striatum <sup>4</sup>	Micro dialyse	SNP, SNAP, SNOG	↑	[156]
Rat	Striatum <sup>5</sup> Hippocampe	Push-pull Perfusion	SIN-1	↑	
<b><u>G- TAURINE</u></b>					
Rat	Striatum <sup>4</sup>	Micro dialyse	SNP, SNAP, SNOG	↑	[156]
Souris	Cortex cérébral <sub>2</sub>		SNP, SNAP	↑	[69]

1- Coupe ; 2- Culture primaire ; 3-Synaptosomes ; 4-Microdialyse ; 5-Push-pull perfusion

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau VII. Les agents du système NO et le syndrome de retrait des principales drogues d'addiction.

(ISDN : isosorbide dinitrate ; les flèches indiquent une baisse ou une augmentation de la sévérité des signes de retrait).

Les produits <sup>a</sup>	Retrait	Effets	Références
L-NAME	Opioides	↓	[3,98,162,263,279,530]
	Ethanol	↓	[5,523]
	Nicotine	↓	[2]
	Opioides	↓	[162,530]
7-NI	Éthanol	↓	[523]
	Opioides	↓	[220,530]
L-NNA	Éthanol	↓	[246]
	Nicotine	↓	[286]
	Opioides	↓	[13]
Agmatine	Éthanol	↓	[526]
	Opioides	↓	[98]
L-NMMA	Opioides	↓	[530]
L-NIO	Opioides	↑	[3]
ISDN <sup>b</sup>	Éthanol	↑	[5]

a, abréviation voir Tableau I. b, donneur de NO, toutes les autres substances du Tableau, sauf

l'ISDN, sont des inhibiteurs de NOS.

## **RÉFÉRENCES**

- [1] Abekawa, T., Ohmori, T. and Koyama, T., Effect of NO synthase inhibition on behavioral changes induced by a single administration of methamphetamine, *Brain Res*, 666 (1994) 147-50.
- [2] Adams, M.L. and Cicero, T.J., Nitric oxide mediates mecamylamine- and naloxone-precipitated nicotine withdrawal, *Eur J Pharmacol*, 345 (1998) R1-2.
- [3] Adams, M.L., Kalicki, J.M., Meyer, E.R. and Cicero, T.J., Inhibition of the morphine withdrawal syndrome by a nitric oxide synthase inhibitor, NG-nitro-L-arginine methyl ester, *Life Sci*, 52 (1993) L245-9.
- [4] Adams, M.L., Meyer, E.R., Sewing, B.N. and Cicero, T.J., Effects of nitric oxide-related agents on alcohol narcosis, *Alcohol Clin Exp Res*, 18 (1994) 969-75.
- [5] Adams, M.L., Sewing, B.N., Chen, J., Meyer, E.R. and Cicero, T.J., Nitric oxide-related agents alter alcohol withdrawal in male rats, *Alcohol Clin Exp Res*, 19 (1995) 195-9.
- [6] Aghajanian, G.K., Tolerance of locus coeruleus neurones to morphine and suppression of withdrawal response by clonidine, *Nature*, 276 (1978) 186-8.
- [7] Akaoka, H. and Aston-Jones, G., Opiate withdrawal-induced hyperactivity of locus coeruleus neurons is substantially mediated by augmented excitatory amino acid input, *J Neurosci*, 11 (1991) 3830-9.
- [8] Alexander, R.C., Wright, R. and Freed, W., Quantitative trait loci contributing to phencyclidine-induced and amphetamine-induced locomotor behavior in inbred mice, *Neuropsychopharmacology*, 15 (1996) 484-90.
- [9] Alreja, M. and Aghajanian, G.K., Opiates suppress a resting sodium-dependent inward current and activate an outward potassium current in locus coeruleus neurons, *J Neurosci*, 13 (1993) 3525-32.
- [10] Alreja, M. and Aghajanian, G.K., QX-314 blocks the potassium but not the sodium-dependent component of the opiate response in locus coeruleus neurons, *Brain Res*, 639 (1994) 320-4.
- [11] Altshuler, H.L., Phillips, P.E. and Feinhandler, D.A., Alteration of ethanol self-administration by naltrexone, *Life Sci*, 26 (1980) 679-88.
- [12] Arden, J.R., Segredo, V., Wang, Z., Lameh, J. and Sadee, W., Phosphorylation and agonist-specific intracellular trafficking of an epitope-tagged mu-opioid receptor expressed in HEK 293 cells, *J Neurochem*, 65 (1995) 1636-45.
- [13] Aricioglu-Kartal, F. and Uzbay, I.T., Inhibitory effect of agmatine on naloxone-precipitated abstinence syndrome in morphine dependent rats, *Life Sci*, 61 (1997) 1775-81.
- [14] Attali, B. and Vogel, Z., Long-term opiate exposure leads to reduction of the alpha i-1 subunit of GTP-binding proteins, *J Neurochem*, 53 (1989) 1636-9.
- [15] Auguet, M., Viossat, I., Marin, J.G. and Chabrier, P.E., Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase by agmatine, *Jpn J Pharmacol*, 69 (1995) 285-7.
- [16] Ball, J.C. and Ross, A. (Eds.), *The Effectiveness of Methadone Maintenance Treatment*, Springer-Verlag, New York, 1991.
- [17] Bannai, S., Induction of cystine and glutamate transport activity in human fibroblasts by diethyl maleate and other electrophilic agents, *J Biol Chem*, 259 (1984) 2435-40.



## RÉFÉRENCES

- [18] Baroni, G.S., Marucci, L., Benedetti, A., Mancini, R., Jezequel, A.M. and Orlandi, F., Chronic ethanol feeding increases apoptosis and cell proliferation in rat liver, *J Hepatol*, 20 (1994) 508-13.
- [19] Barrington, E.J., Evolutionary and comparative aspects of gut and brain peptides, *Br Med Bull*, 38 (1982) 227-32.
- [20] Bates, S. and Vousden, K.H., p53 in signaling checkpoint arrest or apoptosis, *Curr Opin Genet Dev*, 6 (1996) 12-8.
- [21] Bearn, J., Gossop, M. and Strang, J., Randomised double-blind comparison of lofexidine and methadone in the in-patient treatment of opiate withdrawal, *Drug Alcohol Depend*, 43 (1996) 87-91.
- [22] Bechara, A., Damasio, H., Tranel, D. and Damasio, A.R., Deciding advantageously before knowing the advantageous strategy, *Science*, 275 (1997) 1293-5.
- [23] Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A. and Freeman, B.A., Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87 (1990) 1620-4.
- [24] Belknap, J.K. and Crabbe, J.C., Chromosome mapping of gene loci affecting morphine and amphetamine responses in BXD recombinant inbred mice, *Ann N Y Acad Sci*, 654 (1992) 311-23.
- [25] Belknap, J.K., Metten, P., Helms, M.L., O'Toole, L.A., Angeli-Gade, S., Crabbe, J.C. and Phillips, T.J., Quantitative trait loci (QTL) applications to substances of abuse: physical dependence studies with nitrous oxide and ethanol in BXD mice, *Behav Genet*, 23 (1993) 213-22.
- [26] Belknap, J.K., Mogil, J.S., Helms, M.L., Richards, S.P., O'Toole, L.A., Bergeson, S.E. and Buck, K.J., Localization to chromosome 10 of a locus influencing morphine analgesia in crosses derived from C57BL/6 and DBA/2 strains, *Life Sci*, 57 (1995) L117-24.
- [27] Belknap, J.K., Richards, S.P., O'Toole, L.A., Helms, M.L. and Phillips, T.J., Short-term selective breeding as a tool for QTL mapping: ethanol preference drinking in mice, *Behav Genet*, 27 (1997) 55-66.
- [28] Berhow, M.T., Hiroi, N., Kobiarski, L.A., Hyman, S.E. and Nestler, E.J., Influence of cocaine on the JAK-STAT pathway in the mesolimbic dopamine system, *J Neurosci*, 16 (1996) 8019-26.
- [29] Berhow, M.T., Hiroi, N. and Nestler, E.J., Regulation of ERK (extracellular signal regulated kinase), part of the neurotrophin signal transduction cascade, in the rat mesolimbic dopamine system by chronic exposure to morphine or cocaine, *J Neurosci*, 16 (1996) 4707-15.
- [30] Berhow, M.T., Russell, D.S., Terwilliger, R.Z., Beitner-Johnson, D., Self, D.W., Lindsay, R.M. and Nestler, E.J., Influence of neurotrophic factors on morphine- and cocaine-induced biochemical changes in the mesolimbic dopamine system, *Neuroscience*, 68 (1995) 969-79.
- [31] Berntson, G.G., Boysen, S.T. and Cacioppo, J.T., Neurobehavioral organization and the cardinal principle of evaluative bivalence, *Ann N Y Acad Sci*, 702 (1993) 75-102.
- [32] Berrettini, W.H., Ferraro, T.N., Alexander, R.C., Buchberg, A.M. and Vogel, W.H., Quantitative trait loci mapping of three loci controlling morphine preference using inbred mouse strains, *Nat Genet*, 7 (1994) 54-8.

## **RÉFÉRENCES**

- [33] Berridge, K.C., In *Understanding Quality of Life: Scientific Understanding of Enjoyment and Suffering*, Kahneman D., Diener E., Schwarz N. edn., Sage, New York, 1997.
- [34] Bhargava, H.N., Attenuation of tolerance to, and physical dependence on, morphine in the rat by inhibition of nitric oxide synthase, *Gen Pharmacol*, 26 (1995) 1049-53.
- [35] Biava, C. and Mukhlova-Montiel, M., Electron microscopy observations on Councilman-like acidophilic bodies and other forms of acidophilic changes in human liver cells, *Am. J. Pathol.*, 46 (1965) 775-802.
- [36] Binette, J.P. and Binette, M.B., Sequencing proteins extracted from stones, *Scanning Microscopy*, 8 (1994) 233-239.
- [37] Black, M.D., Matthews, E.K. and Humphrey, P.P., The effects of a photosensitive nitric oxide donor on basal and electrically-stimulated dopamine efflux from the rat striatum in vitro, *Neuropharmacology*, 33 (1994) 1357-65.
- [38] Bloom, F., In *The Cognitive Neuroscience*. In M. Gazzaniga (Ed.), MIT press, Cambridge MA, 1995, pp. 1063-1070.
- [39] Blum, K., Briggs, A.H. and Trachtenberg, M.C., Ethanol ingestive behavior as a function of central neurotransmission, *Experientia*, 45 (1989) 444-52.
- [40] Boismare, F., Daoust, M., Moore, N., Saligaut, C., Lhuintre, J.P., Chretien, P. and Durlach, J., A homotaurine derivative reduces the voluntary intake of ethanol by rats: are cerebral GABA receptors involved?, *Pharmacol Biochem Behav*, 21 (1984) 787-9.
- [41] Bonci, A. and Williams, J.T., A common mechanism mediates long-term changes in synaptic transmission after chronic cocaine and morphine, *Neuron*, 16 (1996) 631-9.
- [42] Boobis, A.R., Fawthrop, D.J. and Davies, D.S., Mechanisms of cell death, *Trends Pharmacol Sci*, 10 (1989) 275-80.
- [43] Borg, F. and Weinholdt, T., Bromocriptine in the treatment of the ethanol withdrawal syndrome., *Acta Psychiat Scand*, 65 (1982) 101-111.
- [44] Bose, S., Mathur, M. and Nayak, N.C., A light & electron microscopic study on apoptotic bodies in acute aflatoxin B1 induced injury in the rat liver, *Indian J Med Res*, 94 (1991) 134-8.
- [45] Bourtchuladze, R., Frenguelli, B., Blendy, J., Cioffi, D., Schutz, G. and Silva, A.J., Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein, *Cell*, 79 (1994) 59-68.
- [46] Bredt, D.S. and Snyder, S.H., Nitric oxide, a novel neuronal messenger, *Neuron*, 8 (1992) 3-11.
- [47] Brown, M.E., Anton, R.F., Malcolm, R. and Ballenger, J.C., Alcohol detoxification and withdrawal seizures: clinical support for a kindling hypothesis, *Biol Psychiatry*, 23 (1988) 507-14.
- [48] Bruhwiler, J., Chleide, E., Liegeois, J.F. and Carreer, F., Nitric oxide: a new messenger in the brain, *Neurosci Biobehav Rev*, 17 (1993) 373-84.
- [49] Brune, B., Dimmeler, S., Molina y Vedia, L. and Lapetina, E.G., Nitric oxide: a signal for ADP-ribosylation of proteins, *Life Sci*, 54 (1994) 61-70.

## RÉFÉRENCES

- [50] Buck, K.J., Molecular genetic analysis of the role of GABAergic systems in the behavioral and cellular actions of alcohol, *Behav Genet*, 26 (1996) 313-23.
- [51] Buck, K.J., Crabbe, J.C. and Belknap, J.K., Alcohol and other abused drugs. In K.M. Pfaff D. W., Berrettini W., John T., Maxon SC. (Ed.), *Handbook of Genetic Influences on the Nervous System*, CRC Press, Broca Raton FL, 1998.
- [52] Buck, K.J., Metten, P., Belknap, J.K. and Crabbe, J.C., Quantitative trait loci involved in genetic predisposition to acute alcohol withdrawal in mice., *J. Neurosci*, 17 (1997) 3946-3955.
- [53] Bursch, W., Oberhammer, F. and Schulte-Hermann, R., Cell death by apoptosis and its protective role against disease, *Trends Pharmacol Sci*, 13 (1992) 245-51.
- [54] Bursch, W., Paffe, S., Putz, B., Barthel, G. and Schulte-Hermann, R., Determination of the length of the histological stages of apoptosis in normal liver and in altered hepatic foci of rats, *Carcinogenesis*, 11 (1990) 847-53.
- [55] Bush, D., Fritz, H., Knight, C., Mount, J. and Scott, K., A hirudin-sensitive, growth-related proteinase from human fibroblasts, *Biol Chem*, 379 (1998) 225-229.
- [56] Butler, A.B. and Hodos, W., *Comparative Vertebrate Neuroanatomy*, Wiley, New York, 1996.
- [57] Caine, S.B. and Koob, G.F., Modulation of cocaine self-administration in the rat through D-3 dopamine receptors, *Science*, 260 (1993) 1814-6.
- [58] Calapai, G., Squadrito, F., Altavilla, D., Zingarelli, B., Campo, G.M., Cilia, M. and Caputi, A.P., Evidence that nitric oxide modulates drinking behaviour, *Neuropharmacology*, 31 (1992) 761-4.
- [59] Cappendijk, S.L., de Vries, R. and Dzoljic, M.R., Excitatory amino acid receptor antagonists and naloxone-precipitated withdrawal syndrome in morphine-dependent mice, *Eur Neuropsychopharmacol*, 3 (1993) 111-6.
- [60] Carew, T.J., Molecular enhancement of memory formation, *Neuron*, 16 (1996) 5-8.
- [61] Carlezon, W.A., Jr., Boundy, V.A., Haile, C.N., Lane, S.B., Kalb, R.G., Neve, R.L. and Nestler, E.J., Sensitization to morphine induced by viral-mediated gene transfer, *Science*, 277 (1997) 812-4.
- [62] Carlezon, W.A., Jr. and Wise, R.A., Rewarding actions of phencyclidine and related drugs in nucleus accumbens shell and frontal cortex, *J Neurosci*, 16 (1996) 3112-22.
- [63] Carr, L.G., Foroud, T., Bice, P., Gobbett, T., Ivashina, J., Edenberg, H., Lumeng, L. and Li, T.K., A quantitative trait locus for alcohol consumption in selectively bred rat lines, *Alcohol Clin Exp Res*, 22 (1998) 884-7.
- [64] Carrera, M.R., Ashley, J.A., Parsons, L.H., Wirsching, P., Koob, G.F. and Janda, K.D., Suppression of psychoactive effects of cocaine by active immunization, *Nature*, 378 (1995) 727-30.
- [65] Carriere, R., The growth of liver parenchymal nuclei and its endocrine regulation, *Int Rev Cytol*, 25 (1969) 201-77.
- [66] Cascales, M., Alvarez, A., Gasco, P., Fernandez-Simon, L., Sanz, N. and Bosca, L., Cocaine-induced liver injury in mice elicits specific changes in DNA ploidy and induces programmed death of hepatocytes, *Hepatology*, 20 (1994) 992-1001.

## RÉFÉRENCES

- [67] Celik, T., Zagli, U., Kayir, H. and Uzbay, I.T., Nitric oxide synthase inhibition blocks amphetamine-induced locomotor activity in mice, *Drug Alcohol Depend*, 56 (1999) 109-13.
- [68] Chandler, L.J., Sutton, G., Norwood, D., Sumners, C. and Crews, F.T., Chronic ethanol increases N-methyl-D-aspartate-stimulated nitric oxide formation but not receptor density in cultured cortical neurons, *Mol Pharmacol*, 51 (1997) 733-40.
- [69] Chen, D.Z., Ohkuma, S. and Kuriyama, K., Characteristics of nitric oxide-evoked [3H]taurine release from cerebral cortical neurons, *Neurochem Int*, 28 (1996) 601-7.
- [70] Chen, J., Kelz, M.B., Hope, B.T., Nakabeppu, Y. and Nestler, E.J., Chronic Fos-related antigens: stable variants of deltaFosB induced in brain by chronic treatments, *J Neurosci*, 17 (1997) 4933-41.
- [71] Chiarugi, V. and Ruggiero, M., Role of three cancer &quot;master genes&quot; p53, bcl2 and c-myc on the apoptotic process, *Tumori*, 82 (1996) 205-9.
- [72] Childers, S.R., Opioid receptor-coupled second messenger systems, *Life Sci*, 48 (1991) 1991-2003.
- [73] Christie, M.J., Williams, J.T., Osborne, P.B. and Bellchambers, C.E., Where is the locus in opioid withdrawal?, *Trends Pharmacol Sci*, 18 (1997) 134-40.
- [74] Clarke, A.R., Purdie, C.A., Harrison, D.J., Morris, R.G., Bird, C.C., Hooper, M.L. and Wyllie, A.H., Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways, *Nature*, 362 (1993) 849-52.
- [75] Cleeland, C.S., Gonin, R., Hatfield, A.K., Edmonson, J.H., Blum, R.H., Stewart, J.A. and Pandya, K.J., Pain and its treatment in outpatients with metastatic cancer, *N Engl J Med*, 330 (1994) 592-6.
- [76] Cole, R.L., Konradi, C., Douglass, J. and Hyman, S.E., Neuronal adaptation to amphetamine and dopamine: molecular mechanisms of prodynorphin gene regulation in rat striatum, *Neuron*, 14 (1995) 813-23.
- [77] Collier, H.O., Cellular site of opiate dependence, *Nature*, 283 (1980) 625-9.
- [78] Commandeur, J.N. and Vermeulen, N.P., Molecular and biochemical mechanisms of chemically induced nephrotoxicity: a review, *Chem Res Toxicol*, 3 (1990) 171-94.
- [79] Compton, M.M., A biochemical hallmark of apoptosis: internucleosomal degradation of the genome, *Cancer Metastasis Rev*, 11 (1992) 105-19.
- [80] Cordero-Erausquin, M., Marubio, L.M., Klink, R. and Changeux, J.P., Nicotinic receptor function: new perspectives from knockout mice, *TIPS*, 21 (2000) 211-217.
- [81] Cornish, J.W., Metzger, D., Woody, G.E., Wilson, D., McLellan, A.T., Vandergrift, B. and O'Brien, C.P., Naltrexone pharmacotherapy for opioid dependent federal probationers, *J Subst Abuse Treat*, 14 (1997) 529-34.
- [82] Crabbe, J.C., Where does alcohol act in the brain?, *Mol Psychiatry*, 2 (1997) 17-20.
- [83] Crabbe, J.C., Provisional mapping of quantitative trait loci for chronic ethanol withdrawal severity in BXD recombinant inbred mice, *J Pharmacol Exp Ther*, 286 (1998) 263-71.
- [84] Crabbe, J.C., Belknap, J.K. and Buck, K.J., Genetic animal models of alcohol and drug abuse, *Science*, 264 (1994) 1715-23.
- [85] Crabbe, J.C., Gallaher, E.S., Phillips, T.J. and Belknap, J.K., Genetic determinants of sensitivity to ethanol in inbred mice, *Behav Neurosci*, 108 (1994) 186-95.

## **RÉFÉRENCES**

- [86] Crabbe, J.C. and Harris, R. (Eds.), *The Genetic Basis of Alcohol and Drug Actions*, Plenum Publishing Corporation, New York, 1991.
- [87] Crabbe, J.C., Kosobud, A., Young, E.R. and Janowsky, J.S., Polygenic and single-gene determination of responses to ethanol in BXD/Ty recombinant inbred mouse strains, *Neurobehav Toxicol Teratol*, 5 (1983) 181-7.
- [88] Crabbe, J.C. and Li, T.K., Genetic strategies in preclinical substance abuse research. In F.E. Blooms, Kupfer, D.J. (Ed.), *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*, Raven Press, New York, 1995, pp. 799-811.
- [89] Crabbe, J.C., Phillips, T.J., Feller, D.J., Hen, R., Wenger, C.D., Lessov, C.N. and Schafer, G.L., Elevated alcohol consumption in null mutant mice lacking 5-HT<sub>1B</sub> serotonin receptors, *Nat Genet*, 14 (1996) 98-101.
- [90] Crain, S.M. and Shen, K.F., Modulatory effects of Gs-coupled excitatory opioid receptor functions on opioid analgesia, tolerance, and dependence, *Neurochem Res*, 21 (1996) 1347-51.
- [91] Crawford, C.A., Drago, J., Watson, J.B. and Levine, M.S., Effects of repeated amphetamine treatment on the locomotor activity of the dopamine D1A-deficient mouse, *Neuroreport*, 8 (1997) 2523-7.
- [92] Crawley, J.N., Belknap, J.K., Collins, A., Crabbe, J.C., Frankel, W., Henderson, N., Hitzemann, R.J., Maxson, S.C., Miner, L.L., Silva, A.J., Wehner, J.M., Wynshaw-Boris, A. and Paylor, R., Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies, *Psychopharmacology (Berl)*, 132 (1997) 107-24.
- [93] Crowe, Genetics. In F.E. Blooms, Kupfer, D.J. (Ed.), *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*, Raven Press, New York, 1995, pp. 1821-1833.
- [94] Cuellar, B., Fernandez, A.P., Lizasoain, I., Moro, M.A., Lorenzo, P., Bentura, M.L., Rodrigo, J. and Leza, J.C., Up-regulation of neuronal NO synthase immunoreactivity in opiate dependence and withdrawal, *Psychopharmacology (Berl)*, 148 (2000) 66-73.
- [95] Cunningham, C.L., Localization of genes influencing ethanol-induced conditioned place preference and locomotor activity in BXD recombinant inbred mice, *Psychopharmacology (Berl)*, 120 (1995) 28-41.
- [96] Cunningham, S.T. and Kelley, A.E., Hyperactivity and sensitization to psychostimulants following cholera toxin infusion into the nucleus accumbens, *J Neurosci*, 13 (1993) 2342-50.
- [97] Daaka, Y., Pitcher, J.A., Richardson, M., Stoffel, R.H., Robishaw, J.D. and Lefkowitz, R.J., Receptor and G betagamma isoform-specific interactions with G protein-coupled receptor kinases, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (1997) 2180-5.
- [98] Dambisya, Y.M. and Lee, T.L., Role of nitric oxide in the induction and expression of morphine tolerance and dependence in mice, *Br J Pharmacol*, 117 (1996) 914-8.
- [99] Danysz, W., Dyr, W., Jankowska, E., Glazewski, S. and Kostowski, W., The involvement of NMDA receptors in acute and chronic effects of ethanol, *Alcohol Clin Exp Res*, 16 (1992) 499-504.
- [100] Davidson, M., Shanley, B. and Wilce, P., Increased NMDA-induced excitability during ethanol withdrawal: a behavioural and histological study, *Brain Res*, 674 (1995) 91-6.

## **RÉFÉRENCES**

- [101] Dawson, V.L. and Dawson, T.M., Physiological and toxicological actions of nitric oxide in the central nervous system, *Adv Pharmacol*, 34 (1995) 323-42.
- [102] de Groot, H. and Littauer, A., Hypoxia, reactive oxygen, and cell injury, *Free Radic Biol Med*, 6 (1989) 541-51.
- [103] Deisseroth, K., Bito, H. and Tsien, R.W., Signaling from synapse to nucleus: postsynaptic CREB phosphorylation during multiple forms of hippocampal synaptic plasticity, *Neuron*, 16 (1996) 89-101.
- [104] Deneke, S.M. and Fanburg, B.L., Regulation of cellular glutathione, *Am J Physiol*, 257 (1989) L163-73.
- [105] Dienes, H.P., Popper, H., Arnold, W. and Lobeck, H., Histologic observations in human hepatitis non-A, non-B, *Hepatology*, 2 (1982) 562-71.
- [106] Dini, L., Autuori, F., Lentini, A., Oliverio, S. and Piacentini, M., The clearance of apoptotic cells in the liver is mediated by the asialoglycoprotein receptor, *FEBS Lett*, 296 (1992) 174-8.
- [107] Dini, L., Falasca, L., Lentini, A., Mattioli, P., Piacentini, M., Piredda, L. and Autuori, F., Galactose-specific receptor modulation related to the onset of apoptosis in rat liver, *Eur J Cell Biol*, 61 (1993) 329-37.
- [108] Dohlman, H.G. and Thorner, J., RGS proteins and signaling by heterotrimeric G proteins, *J Biol Chem*, 272 (1997) 3871-4.
- [109] Dole, V.P. and Nyswander, M., Study of methadone as an adjunct in rehabilitation of heroin addicts, *IMJ Ill Med J*, 130 (1966) 487-9.
- [110] Drago, J., Gerfen, C.R., Westphal, H. and Steiner, H., D1 dopamine receptor-deficient mouse: cocaine-induced regulation of immediate-early gene and substance P expression in the striatum, *Neuroscience*, 74 (1996) 813-23.
- [111] Droungas, A., Ehrman, R.N., Childress, A.R. and O'Brien, C.P., Effect of smoking cues and cigarette availability on craving and smoking behavior, *Addict Behav*, 20 (1995) 657-73.
- [112] DuPont, H.L. and Hornick, R.B., Adverse effect of lomotil therapy in shigellosis, *Jama*, 226 (1973) 1525-8.
- [113] Dypbukt, J.M., Thor, H. and Nicotera, P., Intracellular Ca<sup>2+</sup> chelators prevent DNA damage and protect hepatoma 1C1C7 cells from quinone-induced cell killing, *Free Radic Res Commun*, 8 (1990) 347-54.
- [114] Eaton, S.B. and Konner, M., Paleolithic nutrition. A consideration of its nature and current implications, *N Engl J Med*, 312 (1985) 283-9.
- [115] Eliasson, M.J., Huang, Z., Ferrante, R.J., Sasamata, M., Molliver, M.E., Snyder, S.H. and Moskowitz, M.A., Neuronal nitric oxide synthase activation and peroxynitrite formation in ischemic stroke linked to neural damage, *J Neurosci*, 19 (1999) 5910-8.
- [116] Elliott, K., Kest, B., Man, A., Kao, B. and Inturrisi, C.E., N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors, mu and kappa opioid tolerance, and perspectives on new analgesic drug development, *Neuropsychopharmacology*, 13 (1995) 347-56.
- [117] Ellis, H.M. and Horvitz, H.R., Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*, *Cell*, 44 (1986) 817-29.

## **RÉFÉRENCES**

- [118] Elmer, G.I., Evans, J.L., Goldberg, S.R., Epstein, C.J. and Cadet, J.L., Transgenic superoxide dismutase mice: Increased mesolimbic micro-opioid receptors results in greater opioid-induced stimulation and opioid-reinforced behavior, *Behav Pharmacol*, 7 (1996) 628-639.
- [119] Erden, B.F., Ozdemirci, S., Yildiran, G., Utkan, T., Gacar, N. and Ulak, G., Dextromethorphan attenuates ethanol withdrawal syndrome in rats, *Pharmacol Biochem Behav*, 62 (1999) 537-41.
- [120] Faa, G., Ledda-Columbano, G.M., Ambu, R., Congiu, T., Coni, P., Riva, A. and Columbano, A., An electron microscopic study of apoptosis induced by cycloheximide in rat liver, *Liver*, 14 (1994) 270-8.
- [121] Farber, J.L., Kyle, M.E. and Coleman, J.B., Mechanisms of cell injury by activated oxygen species, *Lab Invest*, 62 (1990) 670-9.
- [122] Ferreira, V.M., Valenzuela, C.F. and Morato, G.S., Role of nitric oxide-dependent pathways in ethanol-induced anxiolytic effects in rats, *Alcohol Clin Exp Res*, 23 (1999) 1898-904.
- [123] Fesus, L., Thomazy, V. and Falus, A., Induction and activation of tissue transglutaminase during programmed cell death, *FEBS Lett*, 224 (1987) 104-8.
- [124] Fiore, M.C., Smith, S.S., Jorenby, D.E. and Baker, T.B., The effectiveness of the nicotine patch for smoking cessation. A meta-analysis, *Jama*, 271 (1994) 1940-7.
- [125] First, M.B., *Diagnostic and Statistic Manual of Mental Disorders DSM-IV*, DC Washington edn., American Psychiatric Association, Washington, 1994.
- [126] Foley, K.M., Competent care for the dying instead of physician-assisted suicide, *N Engl J Med*, 336 (1997) 54-8.
- [127] Forstermann, U., Gorsky, L.D., Pollock, J.S., Schmidt, H.H., Heller, M. and Murad, F., Regional distribution of EDRF/NO-synthesizing enzyme(s) in rat brain, *Biochem Biophys Res Commun*, 168 (1990) 727-32.
- [128] Fox, B.S., Kantak, K.M., Edwards, M.A., Black, K.M., Bollinger, B.K., Botka, A.J., French, T.L., Thompson, T.L., Schad, V.C., Greenstein, J.L., Gefter, M.L., Exley, M.A., Swain, P.A. and Briner, T.J., Efficacy of a therapeutic cocaine vaccine in rodent models, *Nat Med*, 2 (1996) 1129-32.
- [129] Frank, R.H., *Passion Within Reason: The Strategic Role of the Emotion*, Norton, New York, 1988.
- [130] Freedman, N.J. and Lefkowitz, R.J., Desensitization of G protein-coupled receptors, *Recent Prog Horm Res*, 51 (1996) 319-51.
- [131] Fridja, N.H., In *The Nature of Emotion*, The Nature of Emotion, Oxford Univ., New York, 1994, pp. 59-67.
- [132] Fryxell, K.J., The evolutionary divergence of neurotransmitter receptors and second-messenger pathways, *J Mol Evol*, 41 (1995) 85-97.
- [133] Fulco, C.E., Liverman, C.T. and Earley, L.E., *Institute of Medicine, Development of Medications for the Treatment of Opiate and Cocaine Addictions : Issues for the Government and Private Sector*., Washington DC, 1995.

## RÉFÉRENCES

- [134] Fuller, R.K., Branchey, L., Brightwell, D.R., Derman, R.M., Emrick, C.D., Iber, F.L., James, K.E., Lacoursiere, R.B., Lee, K.K., Lowenstam, I. and et al., Disulfiram treatment of alcoholism. A Veterans Administration cooperative study, *Jama*, 256 (1986) 1449-55.
- [135] Galea, E., Regunathan, S., Eliopoulos, V., Feinstein, D.L. and Reis, D.J., Inhibition of mammalian nitric oxide synthases by agmatine, an endogenous polyamine formed by decarboxylation of arginine, *Biochem J*, 316 (1996) 247-9.
- [136] Garthwaite, J., Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system, *Trends Neurosci*, 14 (1991) 60-7.
- [137] Garthwaite, J. and Boulton, C.L., Nitric oxide signaling in the central nervous system, *Annu Rev Physiol*, 57 (1995) 683-706.
- [138] Garthwaite, J., Garthwaite, G., Palmer, R.M. and Moncada, S., NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices, *Eur J Pharmacol*, 172 (1989) 413-6.
- [139] Gates, G.A., S., H.K., M., P.H. and Schmidt et al., The cell population of human liver, *J. Lab. Clin. Med.*, 57 (1961) 182-184.
- [140] Gazzaniga, M.S., *The Integrated Mind*, Plenum, New York, 1987.
- [141] Gebhardt, R., Metabolic zonation of the liver: regulation and implications for liver function, *Pharmacol Ther*, 53 (1992) 275-354.
- [142] Gelernter, J., Goldman, D. and Risch, N., The A1 allele at the D2 dopamine receptor gene and alcoholism. A reappraisal, *Jama*, 269 (1993) 1673-7.
- [143] Gerlai, R., Gene-targeting studies of mammalian behavior: is it the mutation or the background genotype?, *Trends Neurosci*, 19 (1996) 177-81.
- [144] Gerstein, D.R. and Harwood, H.J. (Eds.), *Institute of Medecine, Treating Drug Problems*, National Academic Press, Washington DC, 1990.
- [145] Gerstein, D.R., Harwood, M. and Suter, M., *California Department of Alcohol and Drug Programs Executive Summary*., 1994.
- [146] Gilbert, D.G., Meliska, C.J., Williams, C.L. and Jensen, R.A., Subjective correlates of cigarette-smoking-induced elevations of peripheral beta-endorphin and cortisol, *Psychopharmacology*, 106 (1992) 275-81.
- [147] Gilbert, P., *Depression: The Evolution of Powerlessness*., Vol. <ftp://princeton.edu/pub/harnard/Psycholoquy/>, Guilford, Princeton, 1992.
- [148] Giros, B., Jaber, M., Jones, S.R., Wightman, R.M. and Caron, M.G., Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter, *Nature*, 379 (1996) 606-12.
- [149] Gold, M.S., Redmond, D.E., Jr. and Kleber, H.D., Noradrenergic hyperactivity in opiate withdrawal supported by clonidine reversal of opiate withdrawal, *Am J Psychiatry*, 136 (1979) 100-2.
- [150] Gold, S.J., Ni, Y.G., Dohlman, H.G. and Nestler, E.J., Regulators of G-protein signaling (RGS) proteins: region-specific expression of nine subtypes in rat brain, *J Neurosci*, 17 (1997) 8024-37.



## **RÉFÉRENCES**

- [151] Goldin, R.D., Hunt, N.C., Clark, J. and Wickramasinghe, S.N., Apoptotic bodies in a murine model of alcoholic liver disease: reversibility of ethanol-induced changes, *J Pathol*, 171 (1993) 73-6.
- [152] Gonzalez, P., Cabello, P., Germany, A., Norris, B. and Contreras, E., Decrease of tolerance to, and physical dependence on morphine by, glutamate receptor antagonists, *Eur J Pharmacol*, 332 (1997) 257-62.
- [153] Grant, K.A., Valverius, P., Hudspith, M. and Tabakoff, B., Ethanol withdrawal seizures and the NMDA receptor complex, *Eur J Pharmacol*, 176 (1990) 289-96.
- [154] Gray, J.A., *Fear and Stress*, ed. 2 edn., Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1987.
- [155] Grisel, J.E., Belknap, J.K., O'Toole, L.A., Helms, M.L., Wenger, C.D. and Crabbe, J.C., Quantitative trait loci affecting methamphetamine responses in BXD recombinant inbred mouse strains, *J Neurosci*, 17 (1997) 745-54.
- [156] Guevara-Guzman, R., Emson, P.C. and Kendrick, K.M., Modulation of in vivo striatal transmitter release by nitric oxide and cyclic GMP, *J Neurochem*, 62 (1994) 807-10.
- [157] Guguen-Guillouzo, Isolation and culture of animal and human hepatocyte., *Culture of Epithelial Cells*, 1992, pp. 197-223.
- [158] Guguen-Guillouzo, C., Campion, J.P., Brissot, P., Glaise, D., Launois, B., Bourel, M. and Guillouzo, A., High yield preparation of isolated human adult hepatocytes by enzymatic perfusion of the liver, *Cell Biol Int Rep*, 6 (1982) 625-8.
- [159] Guillouzo, A., Clerc, C., Malledant, Y., Chesne, C., Ratanasavanh, D. and Guguen-Guillouzo, C., [Cytoprotection (6). Models for studying hepatic cytoprotection], *Gastroenterol Clin Biol*, 13 (1989) 725-30.
- [160] Gunther, U., Benson, J., Benke, D., Fritschy, J.M., Reyes, G., Knoflach, F., Crestani, F., Aguzzi, A., Arigoni, M., Lang, Y. and et al., Benzodiazepine-insensitive mice generated by targeted disruption of the gamma 2 subunit gene of gamma-aminobutyric acid type A receptors, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92 (1995) 7749-53.
- [161] Hain, N.A.K., Stuhmüller, B., Hahn, G.R., Kalden, J.R., Deutzman, R. and Burmester, G.R., Biochemical characterization and microsequencing of a 205-kDa synovial protein stimulatory for T cells and reactive with rheumatoid factor containing sera, *J. Immunol.*, 157 (1996) 1773-1780.
- [162] Hall, S., Milne, B. and Jhamandas, K., Nitric oxide synthase inhibitors attenuate acute and chronic morphine withdrawal response in the rat locus coeruleus: an in vivo voltammetric study, *Brain Res*, 739 (1996) 182-91.
- [163] Hanbauer, I., Wink, D., Osawa, Y., Edelman, G.M. and Gally, J.A., Role of nitric oxide in NMDA-evoked release of [3H]-dopamine from striatal slices, *Neuroreport*, 3 (1992) 409-12.
- [164] Hara, A., Katsura, M., Higo, A., Hibino, Y. and Ohkuma, S., Enhancement of peroxynitrite-evoked acetylcholine release by hydroxyl radical scavengers from mouse cerebral cortical neurons, *Life Sci*, 63 (1998) 827-33.
- [165] Hardy, P.A., Chen, W. and Wilce, P.A., Chronic ethanol exposure and withdrawal influence NMDA receptor subunit and splice variant mRNA expression in the rat cerebral cortex, *Brain Res*, 819 (1999) 33-9.

## RÉFÉRENCES

- [166] Harris, R.A., McQuilkin, S.J., Paylor, R., Abeliovich, A., Tonegawa, S. and Wehner, J.M., Mutant mice lacking the gamma isoform of protein kinase C show decreased behavioral actions of ethanol and altered function of gamma-aminobutyrate type A receptors, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92 (1995) 3658-62.
- [167] Harris, R.A., Mihic, S.J. and Valenzuela, C.F., Alcohol and benzodiazepines: recent mechanistic studies, *Drug Alcohol Depend*, 51 (1998) 155-64.
- [168] Heilig, M., Engel, J.A. and Soderpalm, B., C-fos antisense in the nucleus accumbens blocks the locomotor stimulant action of cocaine, *Eur J Pharmacol*, 236 (1993) 339-40.
- [169] Henry, M.C., Alary, M., Desmet, P., Gerniers, M., Muteteke, D., Nku, I., Mutombo, L. and Piot, P., Community survey of diarrhoea in children under 5 years in Kinshasa, Zaire, *Ann Soc Belg Med Trop*, 75 (1995) 105-14.
- [170] Hess, E.J., Collins, K.A. and Wilson, M.C., Mouse model of hyperkinesis implicates SNAP-25 in behavioral regulation, *J Neurosci*, 16 (1996) 3104-11.
- [171] Hexum, T.D. and Russett, L.R., Plasma enkephalin-like peptide response to chronic nicotine infusion in guinea pig, *Brain Res*, 406 (1987) 370-2.
- [172] Higgins, G.A., Nguyen, P. and Sellers, E.M., The NMDA antagonist dizocilpine (MK801) attenuates motivational as well as somatic aspects of naloxone precipitated opioid withdrawal, *Life Sci*, 50 (1992) L167-72.
- [173] Highfield, D.A. and Grant, S., Ng-nitro-L-arginine, an NOS inhibitor, reduces tolerance to morphine in the rat locus coeruleus, *Synapse*, 29 (1998) 233-9.
- [174] Higo, A., Katsura, M., Hibino, Y., Hara, A., Tarumi, C. and Ohkuma, S., Removal of hydroxyl radical facilitates Ca<sup>2+</sup>-dependent [3H]GABA release by peroxynitrite, *Brain Res Mol Brain Res*, 62 (1998) 96-100.
- [175] Hilakivi-Clarke, L., Durcan, M. and Goldberg, R., Effect of alcohol on elevated aggressive behavior in male transgenic TGF alpha mice, *Neuroreport*, 4 (1993) 155-8.
- [176] Hinshaw, D.B., Sklar, L.A., Bohl, B., Schraufstatter, I.U., Hyslop, P.A., Rossi, M.W., Spragg, R.G. and Cochrane, C.G., Cytoskeletal and morphologic impact of cellular oxidant injury, *Am J Pathol*, 123 (1986) 454-64.
- [177] Hirata, H. and Cadet, J.L., Methamphetamine-induced serotonin neurotoxicity is attenuated in p53-knockout mice, *Brain Res*, 768 (1997) 345-8.
- [178] Hirata, H. and Cadet, J.L., p53-knockout mice are protected against the long-term effects of methamphetamine on dopaminergic terminals and cell bodies, *J Neurochem*, 69 (1997) 780-90.
- [179] Hiroi, N., Brown, J.R., Haile, C.N., Ye, H., Greenberg, M.E. and Nestler, E.J., FosB mutant mice: loss of chronic cocaine induction of Fos-related proteins and heightened sensitivity to cocaine's psychomotor and rewarding effects, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (1997) 10397-402.
- [180] Hitzemann, B. and Hitzemann, R., Genetics ethanol and the Fos response: a comparison of the C57BL/6J and DBA/2J inbred mouse strains, *Alcohol Clin Exp Res*, 21 (1997) 1497-507.
- [181] Hockenbery, D.M., Oltvai, Z.N., Yin, X.M., Milliman, C.L. and Korsmeyer, S.J., Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis, *Cell*, 75 (1993) 241-51.

## **RÉFÉRENCES**

- [182] Hoebel, B.G., In Steven's Handbook of Experimental Psychology. In H.R.J. Atkinson R. C., Lindzey G., Luce R. D. (Ed.), Wiley, New York, 1988.
- [183] Hoffman, M., A new role for gases: neurotransmission, *Science*, 252 (1991) 1788.
- [184] Homanics, G.E., Ferguson, C., Quinlan, J.J., Daggett, J., Snyder, K., Lagenaur, C., Mi, Z.P., Wang, X.H., Grayson, D.R. and Firestone, L.L., Gene knockout of the alpha6 subunit of the gamma-aminobutyric acid type A receptor: lack of effect on responses to ethanol, pentobarbital, and general anesthetics, *Mol Pharmacol*, 51 (1997) 588-96.
- [185] Homanics, G.E., Le, N.Q., Kist, F., Mihalek, R., Hart, A.R. and Quinlan, J.J., Ethanol tolerance and withdrawal responses in GABA(A) receptor alpha 6 subunit null allele mice and in inbred C57BL/6J and strain 129/SvJ mice, *Alcohol Clin Exp Res*, 22 (1998) 259-65.
- [186] Hope, B.T., Nye, H.E., Kelz, M.B., Self, D.W., Iadarola, M.J., Nakabeppu, Y., Duman, R.S. and Nestler, E.J., Induction of a long-lasting AP-1 complex composed of altered Fos-like proteins in brain by chronic cocaine and other chronic treatments, *Neuron*, 13 (1994) 1235-44.
- [187] Hoyumpa, A.M., Jr., Greene, H.L., Dunn, G.D. and Schenker, S., Fatty liver: biochemical and clinical considerations, *Am J Dig Dis*, 20 (1975) 1142-70.
- [188] Hully, J.R., Chang, L., Schwall, R.H., Widmer, H.R., Terrell, T.G. and Gillett, N.A., Induction of apoptosis in the murine liver with recombinant human activin A, *Hepatology*, 20 (1994) 854-62.
- [189] Hyman, S.E., Addiction to cocaine and amphetamine, *Neuron*, 16 (1996) 901-4.
- [190] Ientile, R., Picciurro, V., Pedale, S., Nucci, C., Malecka, B., Nistico, G. and Macaione, S., Nitric oxide enhances amino acid release from immature chick embryo retina, *Neurosci Lett*, 219 (1996) 79-82.
- [191] Ikeda, M., Komiyama, T., Sato, I., Himi, T. and Murota, S., Neuronal nitric oxide synthase is resistant to ethanol, *Life Sci*, 64 (1999) 1623-30.
- [192] Ishak, K.G., Walker, D.H., Coetzer, J.A.W., Gardner, J.J. and Gorelkin, L., Viralemorrhagic fevers with hepatic involvement : pathologic aspects with clinical correlations., *Liver diseases*, Vol. 7, Grune Stratton, New York, 1982, pp. 495-515.
- [193] Itzhak, Y., Modulation of cocaine- and metamphetamine-induced behavioral sensitization by inhibition of brain nitric oxide synthase, *J Pharmacol Exp Ther*, 282 (1997) 521-527.
- [194] Itzhak, Y. and Martin, J.L., Blockade of alcohol-induced locomotor sensitization and conditioned place preference in DBA mice by 7-nitroindazole, *Brain Res*, 858 (2000) 402-7.
- [195] Jeziorski, M., White, F.J. and Wolf, M.E., MK-801 prevents the development of behavioral sensitization during repeated morphine administration, *Synapse*, 16 (1994) 137-47.
- [196] Jinnah, H.A., Langlais, P.J. and Friedmann, T., Functional analysis of brain dopamine systems in a genetic mouse model of Lesch-Nyhan syndrome, *J Pharmacol Exp Ther*, 263 (1992) 596-607.
- [197] Johansson, C., Jackson, D.M. and Svensson, L., Nitric oxide synthase inhibition blocks phencyclidine-induced behavioural effects on prepulse inhibition and locomotor activity in the rat, *Psychopharmacology (Berl)*, 131 (1997) 167-73.

## RÉFÉRENCES

- [198] Jolas, T. and Aghajanian, G.K., Neurotensin and the serotonergic system, *Prog Neurobiol*, 52 (1997) 455-68.
- [199] Jolas, T. and Aghajanian, G.K., Opioids suppress spontaneous and NMDA-induced inhibitory postsynaptic currents in the dorsal raphe nucleus of the rat in vitro, *Brain Res*, 755 (1997) 229-45.
- [200] Kalivas, P.W., Interactions between dopamine and excitatory amino acids in behavioral sensitization to psychostimulants, *Drug Alcohol Depend*, 37 (1995) 95-100.
- [201] Kantor, D.B., Lanzrein, M., Stary, S.J., Sandoval, G.M., Smith, W.B., Sullivan, B.M., Davidson, N. and Schuman, E.M., A role for endothelial NO synthase in LTP revealed by adenovirus-mediated inhibition and rescue, *Science*, 274 (1996) 1744-8.
- [202] Kappus, H. and Sies, H., Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: redox cycling and lipid peroxidation, *Experientia*, 37 (1981) 1233-41.
- [203] Kaputlu, I. and Uzbay, T., L-NAME inhibits pentylenetetrazole and strychnine-induced seizures in mice, *Brain Res*, 753 (1997) 98-101.
- [204] Kastan, M.B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B. and Craig, R.W., Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage, *Cancer Res*, 51 (1991) 6304-11.
- [205] Kastan, M.B., Zhan, Q., el-Deiry, W.S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W.V., Plunkett, B.S., Vogelstein, B. and Fornace, A.J., Jr., A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia, *Cell*, 71 (1992) 587-97.
- [206] Keane, T.M., Foy, D.W., Nunn, B. and Rychtarik, R.G., Spouse contracting to increase antabuse compliance in alcoholic veterans, *J Clin Psychol*, 40 (1984) 340-4.
- [207] Kelley, A.E. and Holahan, M.R., Enhanced reward-related responding following cholera toxin infusion into the nucleus accumbens, *Synapse*, 26 (1997) 46-54.
- [208] Kerr, J.F., A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes, *J Pathol Bacteriol*, 90 (1965) 419-35.
- [209] Kerr, J.F., An electron microscopic study of liver cell necrosis due to albitocin, *Pathology*, 2 (1970) 251-9.
- [210] Kerr, J.F., Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death, *J Pathol*, 105 (1971) 13-20.
- [211] Kerr, J.F., Wyllie, A.H. and Currie, A.R., Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br J Cancer*, 26 (1972) 239-57.
- [212] Kessler, R.C., Nelson, C.B., McGonagle, K.A., Edlund, M.J., Frank, R.G. and Leaf, P.J., The epidemiology of co-occurring addictive and mental disorders: implications for prevention and service utilization, *Am J Orthopsychiatry*, 66 (1996) 17-31.
- [213] Kest, B., Lee, C.E., McLemore, G.L. and Inturrisi, C.E., An antisense oligodeoxynucleotide to the delta opioid receptor (DOR-1) inhibits morphine tolerance and acute dependence in mice, *Brain Res Bull*, 39 (1996) 185-8.
- [214] Ketelaar, T. and Clore, G.L., In *Personality, Emotion, and Cognitive Science*, Personality, Emotion, and Cognitive Science, Elsevier, Amsterdam, 1997.

## **RÉFÉRENCES**

- [215] Khanna, J.M., Morato, G.S., Shah, G., Chau, A. and Kalant, H., Inhibition of nitric oxide synthesis impairs rapid tolerance to ethanol, *Brain Res Bull*, 32 (1993) 43-7.
- [216] Khantzian, E.J., The self-medication hypothesis of addictive disorders: focus on heroin and cocaine dependence, *Am J Psychiatry*, 142 (1985) 1259-64.
- [217] Kiernan, The anatomy and physiology of the liver. In P.T.R. Soc (Ed.), *Biol Sci*, Vol. 123, London, 1833, pp. 711-770.
- [218] Killian, A., Bonese, K., Rothberg, R.M., Wainer, B.H. and Schuster, C.R., Effects of passive immunization against morphine on heroin self-administration, *Pharmacol Biochem Behav*, 9 (1978) 347-52.
- [219] Kim, H.S. and Park, W.K., Nitric oxide mediation of cocaine-induced dopaminergic behaviors: ambulation-accelerating activity, reverse tolerance and conditioned place preference in mice, *J Pharmacol Exp Ther*, 275 (1995) 551-7.
- [220] Kimes, A.S., Vaupel, D.B. and London, E.D., Attenuation of some signs of opioid withdrawal by inhibitors of nitric oxide synthase, *Psychopharmacology*, 112 (1993) 521-4.
- [221] King, A.C., Volpicelli, J.R., Gunduz, M., O'Brien, C.P. and Kreek, M.J., Naltrexone biotransformation and incidence of subjective side effects: a preliminary study, *Alcohol Clin Exp Res*, 21 (1997) 906-9.
- [222] King, T.P. and Bremner, I., Autophagy and apoptosis in liver during the prehaemolytic phase of chronic copper poisoning in sheep, *J Comp Pathol*, 89 (1979) 515-30.
- [223] Kluger, M.J., *Fever, Its Biology, Evolution, and Function*, Kluger edn., Princeton, Princeton, NJ, 1979.
- [224] Knowles, R.G., Palacios, M., Palmer, R.M. and Moncada, S., Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86 (1989) 5159-62.
- [225] Knych, E.T., Ethanol inhibits nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission in the anococcygeus muscle of the rat, *Alcohol Clin Exp Res*, 18 (1994) 566-70.
- [226] Kogan, J.H., Nestler, E.J. and Aghajanian, G.K., Elevated basal firing rates and enhanced responses to 8-Br-cAMP in locus coeruleus neurons in brain slices from opiate-dependent rats, *Eur J Pharmacol*, 211 (1992) 47-53.
- [227] Kolesnikov, Y.A., Pan, Y.X., Babey, A.M., Jain, S., Wilson, R. and Pasternak, G.W., Functionally differentiating two neuronal nitric oxide synthase isoforms through antisense mapping: evidence for opposing NO actions on morphine analgesia and tolerance, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (1997) 8220-5.
- [228] Kolesnikov, Y.A., Pick, C.G. and Pasternak, G.W., NG-nitro-L-arginine prevents morphine tolerance, *Eur J Pharmacol*, 221 (1992) 399-400.
- [229] Komulainen, H. and Bondy, S.C., Increased free intracellular Ca<sup>2+</sup> by toxic agents: an index of potential neurotoxicity?, *Trends Pharmacol Sci*, 9 (1988) 154-6.
- [230] Konig, M., Zimmer, A.M., Steiner, H., Holmes, P.V., Crawley, J.N., Brownstein, M.J. and Zimmer, A., Pain responses, anxiety and aggression in mice deficient in pre-proenkephalin, *Nature*, 383 (1996) 535-8.

## **RÉFÉRENCES**

- [231] Koob, F. and Bloom, F., Cellular and molecular mechanisms of drug dependence, *Science*, 242 (1988) 715-723.
- [232] Koob, G.F., Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways, *Trends Pharmacol Sci*, 13 (1992) 177-84.
- [233] Koob, G.F., Drug addiction: the yin and yang of hedonic homeostasis, *Neuron*, 16 (1996) 893-6.
- [234] Koob, G.F. and Le Moal, M., Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation, *Science*, 278 (1997) 52-8.
- [235] Koob, G.F., Maldonado, R. and Stinus, L., Neural substrates of opiate withdrawal, *Trends Neurosci*, 15 (1992) 186-91.
- [236] Kornhauser, J.M. and Greenberg, M.E., A kinase to remember: dual roles for MAP kinase in long-term memory, *Neuron*, 18 (1997) 839-42.
- [237] Koros, E., Kostowski, W. and Bienkowski, P., Discriminative stimulus properties of ethanol in rats: studies on the role of nitric oxide, *Pharmacol Biochem Behav*, 62 (1999) 607-12.
- [238] Kotlinska, J. and Liljequist, S., Oral administration of glycine and polyamine receptor antagonists blocks ethanol withdrawal seizures, *Psychopharmacology (Berl)*, 127 (1996) 238-44.
- [239] Kooor, A., Henry, D.J. and Chavkin, C., Agonist-induced desensitization of the mu opioid receptor-coupled potassium channel (GIRK1), *J Biol Chem*, 270 (1995) 589-95.
- [240] Kooor, A., Nappey, V., Kieffer, B.L. and Chavkin, C., Mu and delta opioid receptors are differentially desensitized by the coexpression of beta-adrenergic receptor kinase 2 and beta-arrestin 2 in xenopus oocytes, *J Biol Chem*, 272 (1997) 27605-11.
- [241] Koyuncuoglu, H., Dizdar, Y., Aricioglu, F. and Sayin, U., Effects of MK 801 on morphine physical dependence: attenuation and intensification, *Pharmacol Biochem Behav*, 43 (1992) 487-90.
- [242] Kranzler, H., Hersh, D., Modesto, V. and Nuwayser, E., in 59th Annual Scientific Meeting., *Proceeding of the College on Problems of Drug Dependence*, Government printing Office, Nashville, TN, 1997.
- [243] Kreek, M.J., in *Addictive States*. In C.P. O'Brien, Jaffe, J. H. (Ed.), Raven, New York, 1992, pp. 205-230.
- [244] Kreek, M.J., Opiates, opioids and addiction, *Mol Psychiatry*, 1 (1996) 232-54.
- [245] Kuhar, M.J. and Pilotte, N.S., Neurochemical changes in cocaine withdrawal, *Trends Pharmacol Sci*, 17 (1996) 260-4.
- [246] Lallemand, F. and De Witte, P., L-NNA decreases cortical vascularization, alcohol preference and withdrawal in alcoholic rats, *Pharmacol Biochem Behav*, 58 (1997) 753-61.
- [247] Lancaster, F.E., Alcohol, nitric oxide, and neurotoxicity: is there a connection?--a review, *Alcohol Clin Exp Res*, 16 (1992) 539-41.
- [248] Lane, D.P., Cancer. p53, guardian of the genome, *Nature*, 358 (1992) 15-6.
- [249] Lane-Ladd, S.B., Pineda, J., Boundy, V.A., Pfeuffer, T., Krupinski, J., Aghajanian, G.K. and Nestler, E.J., CREB (cAMP response element-binding protein) in the locus coeruleus: biochemical, physiological, and behavioral evidence for a role in opiate dependence, *J Neurosci*, 17 (1997) 7890-901.

## RÉFÉRENCES

- [250] Lauth, D., Hertting, G. and Jackisch, R., 3,4-Diaminopyridine-evoked noradrenaline release in rat hippocampal slices: facilitation by endogenous or exogenous nitric oxide, *Brain Res*, 692 (1995) 174-82.
- [251] Le Novère, N., Zoli, M., Léna, C., Ferrari, R., Picciotto, M.R., Merlo-Pich, E. and Changeux, J.P., Involvement of alpha-6 nicotinic receptor subunit in nicotine-elicited locomotion, demonstrated by in vivo antisense oligonucleotide infusion, *NeuroReport*, 10 (1999) 24972501.
- [252] LeBlanc, A.E., Kalant, H., Gibbins, R.J. and Berman, N.D., Acquisition and loss of tolerance to ethanol by the rat, *J Pharmacol Exp Ther*, 168 (1969) 244-50.
- [253] Ledda-Columbano, G.M., Coni, P., Curto, M., Giacomini, L., Faa, G., Oliverio, S., Piacentini, M. and Columbano, A., Induction of two different modes of cell death, apoptosis and necrosis, in rat liver after a single dose of thioacetamide, *Am J Pathol*, 139 (1991) 1099-109.
- [254] Ledda-Columbano, G.M., Coni, P., Faa, G., Manenti, G. and Columbano, A., Rapid induction of apoptosis in rat liver by cycloheximide, *Am J Pathol*, 140 (1992) 545-9.
- [255] LeDoux, J., *The Emotional Brain*, Simon & Schuster, New York, 1996.
- [256] Lee, J.M. and Bernstein, A., Apoptosis, cancer and the p53 tumour suppressor gene, *Cancer Metastasis Rev*, 14 (1995) 149-61.
- [257] Leist, M., Gantner, F., Bohlinger, I., Germann, P.G., Tiegs, G. and Wendel, A., Murine hepatocyte apoptosis induced in vitro and in vivo by TNF-alpha requires transcriptional arrest, *J Immunol*, 153 (1994) 1778-88.
- [258] Leist, M., Gantner, F., Bohlinger, I., Tiegs, G., Germann, P.G. and Wendel, A., Tumor necrosis factor-induced hepatocyte apoptosis precedes liver failure in experimental murine shock models, *Am J Pathol*, 146 (1995) 1220-34.
- [259] Lemasters, J.J., DiGuiseppi, J., Nieminen, A.L. and Herman, B., Blebbing, free Ca<sup>2+</sup> and mitochondrial membrane potential preceding cell death in hepatocytes, *Nature*, 325 (1987) 78-81.
- [260] Leonard, T.O. and Lydic, R., Nitric oxide synthase inhibition decreases pontine acetylcholine release, *Neuroreport*, 6 (1995) 1525-9.
- [261] Leonard, T.O. and Lydic, R., Pontine nitric oxide modulates acetylcholine release, rapid eye movement sleep generation, and respiratory rate, *J Neurosci*, 17 (1997) 774-85.
- [262] Levi, G. and Raiteri, M., Carrier-mediated release of neurotransmitter release, *Trends Pharmacol Sci*, 16 (1993) 415-419.
- [263] Leza, J.C., Lizasoain, I., Cuellar, B., Moro, M.A. and Lorenzo, P., Correlation between brain nitric oxide synthase activity and opiate withdrawal, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 353 (1996) 349-54.
- [264] Li, X., Keith, D.E., Jr. and Evans, C.J., Mu opioid receptor-like sequences are present throughout vertebrate evolution, *J Mol Evol*, 43 (1996) 179-84.
- [265] Liang, L.P. and Kaufman, S., The regulation of dopamine release from striatum slices by tetrahydrobiopterin and L-arginine-derived nitric oxide, *Brain Res*, 800 (1998) 181-6.

## RÉFÉRENCES

- [266] Liebermann, D.A., Hoffman, B. and Steinman, R.A., Molecular controls of growth arrest and apoptosis: p53-dependent and independent pathways, *Oncogene*, 11 (1995) 199-210.
- [267] Liljequist, S., The competitive NMDA receptor antagonist, CGP 39551, inhibits ethanol withdrawal seizures, *Eur J Pharmacol*, 192 (1991) 197-8.
- [268] Lin, J.K. and Chou, C.K., In vitro apoptosis in the human hepatoma cell line induced by transforming growth factor beta 1, *Cancer Res*, 52 (1992) 385-8.
- [269] Lisman, J., Malenka, R.C., Nicoll, R.A. and Malinow, R., Learning mechanisms: the case for CaM-KII, *Science*, 276 (1997) 2001-2.
- [270] Lithgow, T., van Driel, R., Bertram, J.F. and Strasser, A., The protein product of the oncogene bcl-2 is a component of the nuclear envelope, the endoplasmic reticulum, and the outer mitochondrial membrane, *Cell Growth Differ*, 5 (1994) 411-7.
- [271] Lonart, G., Cassels, K.L. and Johnson, K.M., Nitric oxide induces calcium-dependent [3H]dopamine release from striatal slices, *J Neurosci Res*, 35 (1993) 192-8.
- [272] Lonart, G., Wang, J. and Johnson, K.M., Nitric oxide induces neurotransmitter release from hippocampal slices, *Eur J Pharmacol*, 220 (1992) 271-2.
- [273] Lorrain, D.S. and Hull, E.M., Nitric oxide increases dopamine and serotonin release in the medial preoptic area, *Neuroreport*, 5 (1993) 87-9.
- [274] Lortie, M.J., Novotny, W.F., Peterson, O.W., Vallon, V., Malvey, K., Mendonca, M., Satriano, J., Insel, P., Thomson, S.C. and Blantz, R.C., Agmatine, a bioactive metabolite of arginine. Production, degradation, and functional effects in the kidney of the rat, *J Clin Invest*, 97 (1996) 413-20.
- [275] Lu, W., Chen, H., Xue, C.J. and Wolf, M.E., Repeated amphetamine administration alters the expression of mRNA for AMPA receptor subunits in rat nucleus accumbens and prefrontal cortex, *Synapse*, 26 (1997) 269-80.
- [276] Lucas, J.J., Segu, L. and Hen, R., 5-Hydroxytryptamine<sub>1B</sub> receptors modulate the effect of cocaine on c-fos expression: converging evidence using 5-hydroxytryptamine<sub>1B</sub> knockout mice and the 5-hydroxytryptamine<sub>1B/1D</sub> antagonist GR127935, *Mol Pharmacol*, 51 (1997) 755-63.
- [277] Machelska, H., Ziolkowska, B., Mika, J., Przewlocka, B. and Przewlocki, R., Chronic morphine increases biosynthesis of nitric oxide synthase in the rat spinal cord, *Neuroreport*, 8 (1997) 2743-7.
- [278] Maeda, S., Kimura, H., Koga, N., Lin, K.H. and Saito, T., Cell density-dependent DNA fragmentation and its suppression by heparin in primary culture of adult rat hepatocytes, *Biochem Biophys Res Commun*, 195 (1993) 270-5.
- [279] Majeed, N.H., Przewlocka, B., Machelska, H. and Przewlocki, R., Inhibition of nitric oxide synthase attenuates the development of morphine tolerance and dependence in mice, *Neuropharmacology*, 33 (1994) 189-92.
- [280] Maldonado, R., Participation of noradrenergic pathways in the expression of opiate withdrawal: biochemical and pharmacological evidence, *Neurosci Biobehav Rev*, 21 (1997) 91-104.



## RÉFÉRENCES

- [281] Maldonado, R., Blendy, J.A., Tzavara, E., Gass, P., Roques, B.P., Hanoune, J. and Schutz, G., Reduction of morphine abstinence in mice with a mutation in the gene encoding CREB, *Science*, 273 (1996) 657-9.
- [282] Maldonado, R., Saiardi, A., Valverde, O., Samad, T.A., Roques, B.P. and Borrelli, E., Absence of opiate rewarding effects in mice lacking dopamine D2 receptors, *Nature*, 388 (1997) 586-9.
- [283] Maldonado, R., Valverde, O., Garbay, C. and Roques, B.P., Protein kinases in the locus coeruleus and periaqueductal gray matter are involved in the expression of opiate withdrawal, *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 352 (1995) 565-75.
- [284] Malin, D.H., Lake, J.R., Carter, V.A., Cunningham, J.S. and Wilson, O.B., Naloxone precipitates nicotine abstinence syndrome in the rat, *Psychopharmacology*, 112 (1993) 339-342.
- [285] Malin, D.H., Lake, J.R., Payne, M.C., Short, P.E., Carter, V.A., Cunningham, J.S. and Wilson, O.B., Nicotine alleviation of nicotine abstinence syndrome is naloxone-reversible, *Pharmacol Biochem Behav*, 53 (1996) 81-85.
- [286] Malin, D.H., Lake, J.R., Shenoi, M., Upchurch, T.P., Johnson, S.C., W.E., S. and Cadle, C.D., The nitric oxide synthesis inhibitor nitro-L-arginine (L-NNA) attenuates nicotine abstinence syndrome in the rat, *Psychopharmacology*, 140 (1998) 371-377.
- [287] Malin, D.H., Murray, J.B., Crucian, G.P., Schweitzer, F.C., Cook, R.E. and Skolnick, M.H., Auricular microelectrostimulation: naloxone reversible attenuation of opiate abstinence syndrome, *Biol Psychiatry*, 24 (1988) 886-890.
- [288] Malorni, W., Paradisi, S., Iosi, F. and Santini, M.T., Two different pathways for necrotic cell death induced by free radicals, *Cell Biol Toxicol*, 9 (1993) 119-30.
- [289] Mandelzys, A., Gruda, M.A., Bravo, R. and Morgan, J.I., Absence of a persistently elevated 37 kDa fos-related antigen and AP-1-like DNA-binding activity in the brains of kainic acid-treated fosB null mice, *J Neurosci*, 17 (1997) 5407-15.
- [290] Mann, H., Ladenheim, B., Hirata, H., Moran, T.H. and Cadet, J.L., Differential toxic effects of methamphetamine (METH) and methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in multidrug-resistant (mdr1a) knockout mice, *Brain Res*, 769 (1997) 340-6.
- [291] Manzoni, O., Prezeau, L., Marin, P., Deshager, S., Bockaert, J. and Fagni, L., Nitric oxide-induced blockade of NMDA receptors, *Neuron*, 8 (1992) 653-62.
- [292] Mardones, J., On the relationship between deficiency of B vitamins and alcohol intakes in rats., *Q. J. Stud. Alcohol*, 12 (1951) 563-575.
- [293] Markel, P.D., Bennett, B., Beeson, M., Gordon, L. and Johnson, T.E., Confirmation of quantitative trait loci for ethanol sensitivity in long-sleep and short-sleep mice, *Genome Res*, 7 (1997) 92-9.
- [294] Marley, R.J., Elmer, G.I. and Goldberg, S.R., The use of pharmacogenetic techniques in drug abuse research, *Pharmacol Ther*, 53 (1992) 217-37.
- [295] Martin, S.J., Green, D.R. and Cotter, T.G., Dicing with death: dissecting the components of the apoptosis machinery, *Trends Biochem Sci*, 19 (1994) 26-30.

## RÉFÉRENCES

- [296] Marubio, L.M., Arroyo-Jimenez, M.D.M., Cordero-Erausquin, M., Léna, C., Le Novere, N., Exaedré, A.K., Huchet, M., Damaj, I.M. and Changeux, J.P., Reduced antinociception in mice lacking neuronal nicotinic receptor subunits, *Nature*, 398 (1999) 805-810.
- [297] Mason, B.J., Ritvo, E.C., Morgan, R.O., Salvato, F.R., Goldberg, G., Welch, B. and Mantero-Atienza, E., A double-blind, placebo-controlled pilot study to evaluate the efficacy and safety of oral nalmefene HCl for alcohol dependence, *Alcohol Clin Exp Res*, 18 (1994) 1162-7.
- [298] Matsuoka, I., Maldonado, R., Defer, N., Noel, F., Hanoune, J. and Roques, B.P., Chronic morphine administration causes region-specific increase of brain type VIII adenylyl cyclase mRNA, *Eur J Pharmacol*, 268 (1994) 215-21.
- [299] Matthes, H.W., Maldonado, R., Simonin, F., Valverde, O., Slowe, S., Kitchen, I., Befort, K., Dierich, A., Le Meur, M., Dolle, P., Tzavara, E., Hanoune, J., Roques, B.P. and Kieffer, B.L., Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene, *Nature*, 383 (1996) 819-23.
- [300] Mattick, R.P. and Hall, W., Are detoxification programmes effective?, *Lancet*, 347 (1996) 97-100.
- [301] Mayford, M., Bach, M.E., Huang, Y.Y., Wang, L., Hawkins, R.D. and Kandel, E.R., Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene, *Science*, 274 (1996) 1678-83.
- [302] Mc Conkey, D., Orrenius, S. and Jondal, M., Cellular signaling in programmed cell death (apoptosis), *Immunol Today*, 11 (1990) 120-126.
- [303] McClearn, G.E., Tarantino, L.M., Rodriguez, L.A., Jones, B.C., Blizard, D.A. and Plomin, R., Genotypic selection provides experimental confirmation for an alcohol consumption quantitative trait locus in mouse, *Mol Psychiatry*, 2 (1997) 486-9.
- [304] McGuire, M.T. and Troisi, A., *Darwinian Psychiatry*, Harvard Univ. Press, Cambridge, MA, 1997.
- [305] McLellan, A.T., Luborsky, L., Woody, G.E. and O'Brien, C.P., An improved diagnostic evaluation instrument for substance abuse patients. The Addiction Severity Index, *J Nerv Ment Dis*, 168 (1980) 26-33.
- [306] Medline, A., Schaffner, F. and Popper, H., Ultrastructural features in galactosamine-induced hepatitis, *Exp Mol Pathol*, 12 (1970) 201-11.
- [307] Meffert, M.K., Calakos, N.C., Scheller, R.H. and Schulman, H., Nitric oxide modulates synaptic vesicle docking/fusion reactions, *Neuron*, 12 (1994) 1235-1244.
- [308] Meffert, M.K., Premack, B.A. and Schulman, H., Nitric oxide stimulates Ca<sup>2+</sup>-independent synaptic vesicle release, *Neuron*, 12 (1994) 1235-44.
- [309] Meister, A. and Anderson, M.E., Glutathione, *Annu Rev Biochem*, 52 (1983) 711-60.
- [310] Melo, J.A., Shendure, J., Pociask, K. and Silver, L.M., Identification of sex-specific quantitative trait loci controlling alcohol preference in C57BL/6 mice, *Nat Genet*, 13 (1996) 147-53.
- [311] Meredith, M.J. and Reed, D.J., Status of the mitochondrial pool of glutathione in the isolated hepatocyte, *J Biol Chem*, 257 (1982) 3747-53.

## RÉFÉRENCES

- [312] Miner, L.L., Drago, J., Chamberlain, P.M., Donovan, D. and Uhl, G.R., Retained cocaine conditioned place preference in D1 receptor deficient mice, *Neuroreport*, 6 (1995) 2314-6.
- [313] Miner, L.L. and Marley, R.J., Chromosomal mapping of the psychomotor stimulant effects of cocaine in BXD recombinant inbred mice, *Psychopharmacology (Berl)*, 122 (1995) 209-14.
- [314] Miserendino, M.J. and Nestler, E.J., Behavioral sensitization to cocaine: modulation by the cyclic AMP system in the nucleus accumbens, *Brain Res*, 674 (1995) 299-306.
- [315] Miyakawa, T., Yagi, T., Kitazawa, H., Yasuda, M., Kawai, N., Tsuboi, K. and Niki, H., Fyn-kinase as a determinant of ethanol sensitivity: relation to NMDA-receptor function, *Science*, 278 (1997) 698-701.
- [316] Mogil, J.S., Sternberg, W.F., Marek, P., Sadowski, B., Belknap, J.K. and Liebeskind, J.C., The genetics of pain and pain inhibition, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 (1996) 3048-55.
- [317] Moncada, S. and Higgs, A., The L-arginine-nitric oxide pathway, *N Engl J Med*, 329 (1993) 2002-12.
- [318] Moncada, S., Higgs, A. and Furchgott, R., International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research, *Pharmacol Rev*, 49 (1997) 137-42.
- [319] Montague, P.R., Gancayco, C.D., Winn, M.J., Marchase, R.B. and Friedlander, M.J., Role of NO production in NMDA receptor-mediated neurotransmitter release in cerebral cortex, *Science*, 263 (1994) 973-7.
- [320] Moore, M., Thor, H., Moore, G., Nelson, S., Moldeus, P. and Orrenius, S., The toxicity of acetaminophen and N-acetyl-p-benzoquinone imine in isolated hepatocytes is associated with thiol depletion and increased cytosolic Ca<sup>2+</sup>, *J Biol Chem*, 260 (1985) 13035-40.
- [321] Moore, P.K., Babbedge, R.C., Wallace, P., Gaffen, Z.A. and Hart, S.L., 7-Nitro indazole, an inhibitor of nitric oxide synthase, exhibits anti-nociceptive activity in the mouse without increasing blood pressure, *Br J Pharmacol*, 108 (1993) 296-7.
- [322] Moore, P.K., Oluyomi, A.O., Babbedge, R.C., Wallace, P. and Hart, S.L., L-NG-nitro arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse, *Br J Pharmacol*, 102 (1991) 198-202.
- [323] Moratalla, R., Elibol, B., Vallejo, M. and Graybiel, A.M., Network-level changes in expression of inducible Fos-Jun proteins in the striatum during chronic cocaine treatment and withdrawal, *Neuron*, 17 (1996) 147-56.
- [324] Moratalla, R., Xu, M., Tonegawa, S. and Graybiel, A.M., Cellular responses to psychomotor stimulant and neuroleptic drugs are abnormal in mice lacking the D1 dopamine receptor, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 (1996) 14928-33.
- [325] Morel, I., Lipoperoxydation et fer, intervention des radicaux libres dans le mécanisme d'action toxique du fer et sur les hépatocytes en culture., *Sciences Biologiques*, Rennes, Rennes, 1989.
- [326] Morgenbesser, S.D., Williams, B.O., Jacks, T. and DePinho, R.A., p53-dependent apoptosis produced by Rb-deficiency in the developing mouse lens, *Nature*, 371 (1994) 72-4.
- [327] Mori, Y., Mikala, G., Varadi, G., Kobayashi, T., Kosh, S., Wakamori, M. and Schwartz, A., Molecular pharmacology of voltage-dependent calcium channels, *Jpn J. Pharmacol*, 72 (1996) 83-109.

## RÉFÉRENCES

- [328] Morley, J.E. and Flood, J.F., Evidence that nitric oxide modulates food intake in mice, *Life Sci*, 49 (1991) 707-11.
- [329] Morrisett, R.A., Rezvani, A.H., Overstreet, D., Janowsky, D.S., Wilson, W.A. and Swartzwelder, H.S., MK-801 potently inhibits alcohol withdrawal seizures in rats, *Eur J Pharmacol*, 176 (1990) 103-5.
- [330] Morse, A.C., Erwin, V.G. and Jones, B.C., Pharmacogenetics of cocaine: a critical review, *Pharmacogenetics*, 5 (1995) 183-92.
- [331] Muller, M., Strand, S., Hug, H., Heinemann, E.M., Walczak, H., Hofmann, W.J., Stremmel, W., Krammer, P.H. and Galle, P.R., Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53, *J Clin Invest*, 99 (1997) 403-13.
- [332] Murachi, T., Intracellular Ca<sup>2+</sup> protease and its inhibition: calpain and calpastatin. In C. WY (Ed.), *Calcium and cell function.*, FI Academic, Orlando, 1983, pp. 376-410.
- [333] Murphy, S.T. and Zajonc, R.B., Affect, cognition, and awareness: affective priming with optimal and suboptimal stimulus exposures, *J Pers Soc Psychol*, 64 (1993) 723-39.
- [334] Nabeshima, T., Itoh, A., Kobayashi, K., Morita, S., Mizuguchi, T., Sawada, H., Nitta, A., Hasegawa, T., Hayashi, K. and Nagatsu, T., Effects of subacute administration of methamphetamine and nicotine on locomotor activity in transgenic mice expressing the human tyrosine hydroxylase gene, *J Neural Transm Gen Sect*, 97 (1994) 41-9.
- [335] Nace, E.P., In Substance Abuse. In R.P. Lowinson J. H., Millman R. R. B., Langord J. G. (Ed.), Baltimore MD, 1997, pp. 383-390.
- [336] Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F.H., Verma, I.M. and Trono, D., In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector, *Science*, 272 (1996) 263-7.
- [337] Natoli, G., Ianni, A., Costanzo, A., De Petrillo, G., Ilari, I., Chirillo, P., Balsano, C. and Levrero, M., Resistance to Fas-mediated apoptosis in human hepatoma cells, *Oncogene*, 11 (1995) 1157-64.
- [338] Nesse, R.M., "What is mood for?", *Psychology* [on-line], 2 (1991) 9.2.
- [339] Nesse, R.M. and Berridge, K.C., Psychoactive drug use in evolutionary perspective, *Science*, 278 (1997) 63-6.
- [340] Nesse, R.M. and Williams, G.W., *Why We Get Sick: The New Scientist of Darwinian Medicine*, Vintage Books, New York, 1995.
- [341] Nestler, E.J., Molecular mechanisms of drug addiction, *J Neurosci*, 12 (1992) 2439-50.
- [342] Nestler, E.J., Under siege: The brain on opiates, *Neuron*, 16 (1996) 897-900.
- [343] Nestler, E.J. and Aghajanian, G.K., Molecular and cellular basis of addiction, *Science*, 278 (1997) 58-63.
- [344] Nicotera, P., Dypbukt, J.M., Rossi, A.D., Manzo, L. and Orrenius, S., Thiol modification and cell signalling in chemical toxicity, *Toxicol Lett*, 64-65 Spec No (1992) 563-7.
- [345] Nicotera, P. and Orrenius, S., Ca<sup>2+</sup> and cell death, *Ann N Y Acad Sci*, 648 (1992) 17-27.
- [346] Nowicki, J.P., Duval, D., Poignet, H. and Scatton, B., Nitric oxide mediates neuronal death after focal cerebral ischemia in the mouse, *Eur J Pharmacol*, 204 (1991) 339-40.

## **RÉFÉRENCES**

- [347] Nye, H.E. and Nestler, E.J., Induction of chronic Fos-related antigens in rat brain by chronic morphine administration, *Mol Pharmacol*, 49 (1996) 636-45.
- [348] O'Brien, C.P., In *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. In H.J.G.a.L.L. E. (Ed.), McGraw-Hill, New York, 1995, pp. 557-577.
- [349] O'Brien, C.P., Recent developments in the pharmacotherapy of substance abuse, *J Consult Clin Psychol*, 64 (1996) 677-86.
- [350] O'Brien, C.P. and McLellan, A.T., Myths about the treatment of addiction, *Lancet*, 347 (1996) 237-40.
- [351] O'Brien, C.P., Testa, T., O'Brien, T.J., Brady, J.P. and Wells, B., Conditioned narcotic withdrawal in humans, *Science*, 195 (1977) 1000-2.
- [352] O'Malley, S.S., Jaffe, A.J., Chang, G., Schottenfeld, R.S., Meyer, R.E. and Rounsaville, B., Naltrexone and coping skills therapy for alcohol dependence. A controlled study, *Arch Gen Psychiatry*, 49 (1992) 881-7.
- [353] Oatley, K. and Johnson-Laird, P.N., In *Goals and Affects.*, Goals and Affects, Erlbaum, Hillsdale, NJ, 1995.
- [354] Oberhammer, F., Fritsch, G., Pavelka, M., Froschl, G., Tiefenbacher, R., Purchio, T. and Schulte-Hermann, R., Induction of apoptosis in cultured hepatocytes and in the regressing liver by transforming growth factor-beta 1 occurs without activation of an endonuclease, *Toxicol Lett*, 64-65 Spec No (1992) 701-4.
- [355] Oberhammer, F., Wilson, J.W., Dive, C., Morris, I.D., Hickman, J.A., Wakeling, A.E., Walker, P.R. and Sikorska, M., Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation, *Embo J*, 12 (1993) 3679-84.
- [356] Ogden, J.E. and Moore, P.K., Inhibition of nitric oxide synthase--potential for a novel class of therapeutic agent?, *Trends Biotechnol*, 13 (1995) 70-8.
- [357] Ohkuma, S. and Katsura, M., Nitric oxide and peroxynitrite as factors to stimulate neurotransmitter release in the CNS, *Prog Neurobiol*, 64 (2001) 97-108.
- [358] Ohkuma, S., Katsura, M., Chen, D.Z., Guo, J.L. and Kuriyama, K., Hydroxyl radical scavengers enhance nitric oxide-evoked acetylcholine release from mouse cerebral cortical neurons, *Brain Res Mol Brain Res*, 34 (1995) 347-50.
- [359] Ohkuma, S., Katsura, M., Chen, D.Z., Narihara, H. and Kuriyama, K., Removal of hydroxyl radical increases nitric oxide generators-induced [3H]GABA release from mouse cerebral cortical neurons, *Neurosci Lett*, 194 (1995) 101-4.
- [360] Ohkuma, S., Katsura, M., Chen, D.Z., Narihara, H. and Kuriyama, K., Nitric oxide-evoked [3H] gamma-aminobutyric acid release is mediated by two distinct release mechanisms, *Brain Res Mol Brain Res*, 36 (1996) 137-44.
- [361] Ohkuma, S., Katsura, M., Guo, J.L., Hasegawa, T. and Kuriyama, K., Involvement of peroxynitrite in N-methyl-D-aspartate- and sodium nitroprusside-induced release of acetylcholine from mouse cerebral cortical neurons, *Brain Res Mol Brain Res*, 31 (1995) 185-93.

## RÉFÉRENCES

- [362] Ohkuma, S., Katsura, M., Guo, J.L., Hasegawa, T. and Kuriyama, K., Participation of peroxynitrite in acetylcholine release induced by nitric oxide generators, *Neurosci Lett*, 183 (1995) 151-4.
- [363] Ohkuma, S., Katsura, M., Guo, J.L., Narihara, H., Hasegawa, T. and Kuriyama, K., Role of peroxynitrite in [3H] gamma-aminobutyric acid release evoked by nitric oxide and its mechanism, *Eur J Pharmacol*, 301 (1996) 179-88.
- [364] Ohkuma, S., Katsura, M., Hibino, Y., Hara, A., Shirotani, K., Ishikawa, E. and Kuriyama, K., Mechanisms for facilitation of nitric oxide-evoked [3H]GABA release by removal of hydroxyl radical, *J Neurochem*, 71 (1998) 1501-10.
- [365] Ohkuma, S., Katsura, M., Hibino, Y., Xu, J., Shirotani, K. and Kuriyama, K., Multiple action of nitric oxide on voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels in mouse cerebral cortical neurons, *Mol. Brain Res.*, 54 (1998) 133-140.
- [366] Ohkuma, S., Narihara, H., Katsura, M., Hasegawa, T. and Kuriyama, K., Nitric oxide-induced [3H] GABA release from cerebral cortical neurons is mediated by peroxynitrite, *J Neurochem*, 65 (1995) 1109-14.
- [367] Ohno, M., Arai, I. and Watanabe, S., N-methyl-D-aspartate stimulates dopamine release through nitric oxide formation in the nucleus accumbens of rats, *Brain Res*, 699 (1995) 332-5.
- [368] Ohno, M. and Watanabe, S., Nitric oxide synthase inhibitors block behavioral sensitization to methamphetamine in mice, *Eur J Pharmacol*, 275 (1995) 39-44.
- [369] Olafsdottir, K. and Reed, D.J., Retention of oxidized glutathione by isolated rat liver mitochondria during hydroperoxide treatment, *Biochim Biophys Acta*, 964 (1988) 377-82.
- [370] Ortiz, J., Fitzgerald, L.W., Charlton, M., Lane, S., Trevisan, L., Guitart, X., Shoemaker, W., Duman, R.S. and Nestler, E.J., Biochemical actions of chronic ethanol exposure in the mesolimbic dopamine system, *Synapse*, 21 (1995) 289-98.
- [371] Ortiz, J., Fitzgerald, L.W., Lane, S., Terwilliger, R. and Nestler, E.J., Biochemical adaptations in the mesolimbic dopamine system in response to repeated stress, *Neuropsychopharmacology*, 14 (1996) 443-52.
- [372] Pak, Y., Kouvelas, A., Scheideler, M.A., Rasmussen, J., O'Dowd, B.F. and George, S.R., Agonist-induced functional desensitization of the mu-opioid receptor is mediated by loss of membrane receptors rather than uncoupling from G protein, *Mol Pharmacol*, 50 (1996) 1214-22.
- [373] Pasternak, G.W. and Standifer, K.M., Mapping of opioid receptors using antisense oligodeoxynucleotides: correlating their molecular biology and pharmacology, *Trends Pharmacol Sci*, 16 (1995) 344-50.
- [374] Patel, T., Bronk, S.F. and Gores, G.J., Increases of intracellular magnesium promote glycodeoxycholate-induced apoptosis in rat hepatocytes, *J Clin Invest*, 94 (1994) 2183-92.
- [375] Pato, C.N., Macciardi, F., Pato, M.T., Verga, M. and Kennedy, J.L., Review of the putative association of dopamine D2 receptor and alcoholism: a meta-analysis, *Am J Med Genet*, 48 (1993) 78-82.
- [376] Pei, G., Kieffer, B.L., Lefkowitz, R.J. and Freedman, N.J., Agonist-dependent phosphorylation of the mouse delta-opioid receptor: involvement of G protein-coupled receptor kinases but not protein kinase C, *Mol Pharmacol*, 48 (1995) 173-7.

## RÉFÉRENCES

- [377] Peroutka, S.J., 5-Hydroxytryptamine receptors in vertebrates and invertebrates: why are there so many?, *Neurochem Int*, 25 (1994) 533-6.
- [378] Persson, M.G. and Gustafsson, L.E., Ethanol can inhibit nitric oxide production, *Eur J Pharmacol*, 224 (1992) 99-100.
- [379] Phillips, T.J., Crabbe, J.C., Metten, P. and Belknap, J.K., Localization of genes affecting alcohol drinking in mice, *Alcohol Clin Exp Res*, 18 (1994) 931-41.
- [380] Phillips, T.J., Huson, M., Gwiazdon, C., Burkhart-Kasch, S. and Shen, E.H., Effects of acute and repeated ethanol exposures on the locomotor activity of BXD recombinant inbred mice, *Alcohol Clin Exp Res*, 19 (1995) 269-78.
- [381] Phillips, T.J., Huson, M.G. and McKinnon, C.S., Localization of genes mediating acute and sensitized locomotor responses to cocaine in BXD/Ty recombinant inbred mice, *J Neurosci*, 18 (1998) 3023-34.
- [382] Piacentini, Tissue transglutaminase in cells undergoing apoptosis. In T.a. Cope (Ed.), *Apoptosis II : The molecular basis of apoptosis in disease*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1994, pp. 143-164.
- [383] Piazza, P.V. and Le Moal, M.L., Pathophysiological basis of vulnerability to drug abuse: role of an interaction between stress, glucocorticoids, and dopaminergic neurons, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 36 (1996) 359-78.
- [384] Picciotto, M.R., Zoli, M., Rimondini, R., Lena, C., Marubio, L.M., Pich, E.M., Fuxe, K. and Changeux, J.P., Acetylcholine receptors containing the beta2 subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine, *Nature*, 391 (1998) 173-7.
- [385] Pich, E.M., Pagliusi, S.R., Tessari, M., Talabot-Ayer, D., Hooft van Huijsduijnen, R. and Chiamulera, C., Common neural substrates for the addictive properties of nicotine and cocaine, *Science*, 275 (1997) 83-6.
- [386] Pineyro, G., Castanon, N., Hen, R. and Blier, P., Regulation of [3H]5-HT release in raphe, frontal cortex and hippocampus of 5-HT1B knock-out mice, *Neuroreport*, 7 (1995) 353-9.
- [387] Pomerleau, C.S., Co-factors for smoking and evolutionary psychobiology, *Addiction*, 92 (1997) 397-408.
- [388] Popik, P., Mamczarz, J., Fraczek, M., Widla, M., Hesselink, M. and Danysz, W., Inhibition of reinforcing effects of morphine and naloxone-precipitated opioid withdrawal by novel glycine site and uncompetitive NMDA receptor antagonists, *Neuropharmacology*, 37 (1998) 1033-42.
- [389] Prast, H., Fischer, H., Werner, E., Werner-Felmayer, G. and Philippu, A., Nitric oxide modulates the release of acetylcholine in the ventral striatum of the freely moving rat, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 352 (1995) 67-73.
- [390] Prast, H. and Philippu, A., Nitric oxide releases acetylcholine in the basal forebrain, *Eur J Pharmacol*, 216 (1992) 139-40.
- [391] Pribbenow, B. and Erber, J., Modulation of antennal scanning in the honeybee by sucrose stimuli, serotonin, and octopamine: behavior and electrophysiology, *Neurobiol Learn Mem*, 66 (1996) 109-20.
- [392] Price, J., Sloman, L., Gardner, R., Jr., Gilbert, P. and Rohde, P., The social competition hypothesis of depression, *Br J Psychiatry*, 164 (1994) 309-15.

## **RÉFÉRENCES**

- [393] Pritchard, D.J. and Butler, W.H., Apoptosis--the mechanism of cell death in dimethylnitrosamine-induced hepatotoxicity, *J Pathol*, 158 (1989) 253-60.
- [394] Przegalinski, E. and Filip, M., Nitric oxide (NO) pathway and locomotor hyperactivity towards dopaminomimetics in rats, *Pol J Pharmacol*, 49 (1997) 291-8.
- [395] Przewlocka, B., Turchan, J., Machelska, H., Labuz, D. and Lason, W., Nitric oxide synthase inhibitor L-NAME prevents amphetamine-induced prodynorphin gene expression in the rat, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 20 (1996) 1229-37.
- [396] Pucilowski, O., Ayensu, W.K. and D'Ercole, A.J., Insulin-like growth factor I expression alters acute sensitivity and tolerance to ethanol in transgenic mice, *Eur J Pharmacol*, 305 (1996) 57-62.
- [397] Pudiak, C.M. and Bozarth, M.A., L-NAME and MK-801 attenuate sensitization to the locomotor-stimulating effect of cocaine, *Life Sci*, 53 (1993) 1517-24.
- [398] Punch, L.J., Self, D.W., Nestler, E.J. and Taylor, J.R., Opposite modulation of opiate withdrawal behaviors on microinfusion of a protein kinase A inhibitor versus activator into the locus coeruleus or periaqueductal gray, *J Neurosci*, 17 (1997) 8520-7.
- [399] Quock, R.M., Mueller, J.L., Vaughn, L.K. and Belknap, J.K., Nitrous oxide antinociception in BXD recombinant inbred mouse strains and identification of quantitative trait loci, *Brain Res*, 725 (1996) 23-9.
- [400] Quock, R.M. and Nguyen, E., Possible involvement of nitric oxide in chlordiazepoxide-induced anxiolysis in mice, *Life Sci*, 51 (1992) L255-60.
- [401] Rappaport, A.M., Y., B.Z., M., L.W. and N., L.W., Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit. Role in hepatic physiology and pathology, *Anat Recl*, 119 (1954) 11-33.
- [402] Rasmussen, K. and Aghajanian, G.K., Withdrawal-induced activation of locus coeruleus neurons in opiate-dependent rats: attenuation by lesions of the nucleus paragigantocellularis, *Brain Res*, 505 (1989) 346-50.
- [403] Ratanasavanh, D., Baffet, G., Latinier, M.F., Rissel, M. and Guillouzo, A., Use of hepatocyte co-cultures in the assessment of drug toxicity from chronic exposure, *Xenobiotica*, 18 (1988) 765-71.
- [404] Ray, S.D., Kamendulis, L.M., Gurule, M.W., Yorkin, R.D. and Corcoran, G.B., Ca<sup>2+</sup> antagonists inhibit DNA fragmentation and toxic cell death induced by acetaminophen, *Faseb J*, 7 (1993) 453-63.
- [405] Ray, S.D., Sorge, C.L., Kamendulis, L.M. and Corcoran, G.B., Ca(++)-activated DNA fragmentation and dimethylnitrosamine-induced hepatic necrosis: effects of Ca(++)-endonuclease and poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors in mice, *J Pharmacol Exp Ther*, 263 (1992) 387-94.
- [406] Raynor, K., Murphy, W.A., Coy, D.H., Taylor, J.E., Moreau, J.P., Yasuda, K., Bell, G.I. and Reisine, T., Cloned somatostatin receptors: identification of subtype-selective peptides and demonstration of high affinity binding of linear peptides, *Mol Pharmacol*, 43 (1993) 838-44.
- [407] Reed, J.C., Bcl-2 and the regulation of programmed cell death, *J Cell Biol*, 124 (1994) 1-6.
- [408] Reed, J.C., Regulation of apoptosis by bcl-2 family proteins and its role in cancer and chemoresistance, *Curr Opin Oncol*, 7 (1995) 541-6.
- [409] Reis, D.J. and Regunathan, S., Agmatine: a novel neurotransmitter?, *Adv Pharmacol*, 42 (1998) 645-9.



## **RÉFÉRENCES**

- [410] Reisine, T. and Pasternak, G., in *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. In L.L.E. Hardman J. G. (Ed.), McGraw-Hill, New York, 1995, pp. 21-555.
- [411] Rezvani, A.H., Grady, D.R., Peek, A.E. and Pucilowski, O., Inhibition of nitric oxide synthesis attenuates alcohol consumption in two strains of alcohol-preferring rats, *Pharmacol Biochem Behav*, 50 (1995) 265-70.
- [412] Riah, O., *Mécanisme d'action de la cotinine : Interactions nicotiques, étude pharmacocinétique et pharmacodynamique, identification et purification de son récepteur.*, Science des agroressources, Institut National Polytechniques, Toulouse, 1996, pp. 211.
- [413] Riah, O., Identification of a non nicotinic, p40 antibodies blocked cotinine-induced dopamine release response in rat striatal synatosome and it potentiation by mecamlamine and methyllycaconitine,, (in preparation).
- [414] Riah, O., Courriere, P., Dousset, J.C. and Belahsen, Y., Cotinine is psychoactive through p40., IOe Neuropharmacology conference. Abstract, Maryland, USA., 2000.
- [415] Riah, O., Courriere, P., Dousset, J.C., Todeschi, N. and Labat, C., Nicotine is more efficient than cotinine at passing the blood-brain barrier in rats, *Cell Mol Neurobiol*, 18 (1998) 311-8.
- [416] Riah, O., Dousset, J. and Courriere, P., Metabolite de la nicotine, la cotinine deviendra-t-elle un jour un médicament?, *Le quotidien du Medecin*, Vol. 6168, 1997, pp. 11.
- [417] Riah, O., Dousset, J. and Courriere, P., Cotinine, from tobacco smoke to gene, *Bulletin de l'ARN* (1998) 30-35.
- [418] Riah, O., Dousset, J. and Dousset, N., Hydroperoxide cascade signaling upon cotinine administration to mice. In T.X.B.M.o.t.S.f.F.R.R. International (Ed.), *Role of free radicals, oxidants and antioxidants, in molecular and cell biology and life process. New developments and techniques*, Paris, 2002.
- [419] Riah, O., Dousset, J.C., Bofill-Cardona, E. and Courriere, P., Isolation and microsequencing of a novel cotinine receptor, *Cell Mol Neurobiol*, 20 (2000) 653-64.
- [420] Riah, O., Dousset, J.C., Courrière, P. and Belahsen, Y., Cotinine in handling stress: II- Anti stress activity of nicotine at the p40 receptor level, *Nicotine Tob Res* (Submitted).
- [421] Riah, O., Dousset, J.C., Courrière, P. and Malmay, M.F., Regulation of cotinine transport into brain by peripheral nicotinic acetylcholine receptors, *Brain Res Bull* (submitted).
- [422] Riah, O., Dousset, J.C., Courriere, P., Baziard-Mouysset, G. and Ecalle, R., Synthesis of cotinine and cotinine N-oxide : evaluation of their interaction with nicotine in the insecticidal activity., *Nat Prod Lett*, 11 (1997) 37-45.
- [423] Riah, O., Dousset, J.C., Courriere, P., Stigliani, J.L., Baziard-Mouysset, G. and Belahsen, Y., Evidence that nicotine acetylcholine receptors are not the main targets of cotinine toxicity, *Toxicol Lett*, 109 (1999) 21-9.
- [424] Riah, O., Dousset, J.C., Labat, C. and Belahsen, Y., Cotinine in handling stress: I- Mobilization of endogenous cotinine, *Nicotine Tob Res* (submitted).
- [425] Risinger, F.O., Bormann, N.M. and Oakes, R.A., Reduced sensitivity to ethanol reward, but not ethanol aversion, in mice lacking 5-HT1B receptors, *Alcohol Clin Exp Res*, 20 (1996) 1401-5.

## RÉFÉRENCES

- [426] Risinger, F.O. and Cunningham, C.L., Ethanol-induced conditioned taste aversion in BXD recombinant inbred mice, *Alcohol Clin Exp Res*, 22 (1998) 1234-44.
- [427] Robinson, T.E. and Berridge, K.C., The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction, *Brain Res Brain Res Rev*, 18 (1993) 247-91.
- [428] Rocha, B.A., Ator, R., Emmett-Oglesby, M.W. and Hen, R., Intravenous cocaine self-administration in mice lacking 5-HT<sub>1B</sub> receptors, *Pharmacol Biochem Behav*, 57 (1997) 407-12.
- [429] Rodriguez, L.A., Plomin, R., Blizard, D.A., Jones, B.C. and McClearn, G.E., Alcohol acceptance, preference, and sensitivity in mice. II. Quantitative trait loci mapping analysis using BXD recombinant inbred strains, *Alcohol Clin Exp Res*, 19 (1995) 367-73.
- [430] Rose, J.E., Behm, F.M. and Westman, E.C., Nicotine-mecamylamine treatment for smoking cessation: The role of pre-cessation therapy, *Exp Clin Psychopharmacol*, 6 (1998) 331-343.
- [431] Rose, J.E., Behm, F.M. and Westman, E.C., Acute effects of nicotine and mecamylamine on tobacco withdrawal symptoms, cigarette reward and ad lib smoking, *Pharmacol Biochem Behav*, 68 (2001) 187-97.
- [432] Rose, J.E., Behm, F.M., Westman, E.C., Levin, E.D., Stein, R.M. and Ripka, G.V., Mecamylamine combined with nicotine skin patch facilitates smoking cessation beyond nicotine patch treatment alone, *Clin Pharmacol Ther*, 56 (1994) 86-99.
- [433] Rosser, B.G. and Gores, G.J., Liver cell necrosis: cellular mechanisms and clinical implications, *Gastroenterology*, 108 (1995) 252-75.
- [434] Rossetti, Z.L. and Carboni, S., Ethanol withdrawal is associated with increased extracellular glutamate in the rat striatum, *Eur J Pharmacol*, 283 (1995) 177-83.
- [435] Rossi, A., Manzo, L., Orrenius, S., Vahter, M. and Nicotera, P., Modifications of cell signalling in the cytotoxicity of metals, *Pharmacol Toxicol*, 68 (1991) 424-9.
- [436] Rossi, G.C., Su, W., Leventhal, L., Su, H. and Pasternak, G.W., Antisense mapping DOR-1 in mice: further support for delta receptor subtypes, *Brain Res*, 753 (1997) 176-9.
- [437] Rothenberg, S., Schottenfeld, S., Meyer, R.E., Krauss, B. and Gross, K., Performance differences between addicts and non-addicts, *Psychopharmacology (Berl)*, 52 (1977) 299-306.
- [438] Rounsaville, B.J., Kosten, T. and Kleber, H., Success and failure at outpatient opioid detoxification. Evaluating the process of clonidine- and methadone-assisted withdrawal, *J Nerv Ment Dis*, 173 (1985) 103-10.
- [439] Rubinstein, M., Phillips, T.J., Bunzow, J.R., Falzone, T.L., Dziewczapolski, G., Zhang, G., Fang, Y., Larson, J.L., McDougall, J.A., Chester, J.A., Saez, C., Pugsley, T.A., Gershanik, O., Low, M.J. and Grandy, D.K., Mice lacking dopamine D<sub>4</sub> receptors are supersensitive to ethanol, cocaine, and methamphetamine, *Cell*, 90 (1997) 991-1001.
- [440] Ryabinin, A.E., Role of hippocampus in alcohol-induced memory impairment: implications from behavioral and immediate early gene studies, *Psychopharmacology (Berl)*, 139 (1998) 34-43.
- [441] Salmon, A.M., Damaj, I.M., Sekine, S., Picciotto, M.R., Marubio, L.M. and Changeux, J.P., Modulation of morphine analgesia in alphaCGRP mutant mice, *NeuroReport*, 10 (1999) 849-854.

## **RÉFÉRENCES**

- [442] Samson, H.H. and Harris, R.A., Neurobiology of alcohol abuse, *Trends Pharmacol Sci*, 13 (1992) 206-11.
- [443] Sanchez-Blazquez, P., Garcia-Espana, A. and Garzon, J., Antisense oligodeoxynucleotides to opioid mu and delta receptors reduced morphine dependence in mice: role of delta-2 opioid receptors, *J Pharmacol Exp Ther*, 280 (1997) 1423-31.
- [444] Saran, M. and Bors, W., Radical reactions in vivo--an overview, *Radiat Environ Biophys*, 29 (1990) 249-62.
- [445] Sass, H., Soyka, M., Mann, K. and Zieglgansberger, W., Relapse prevention by acamprosate. Results from a placebo-controlled study on alcohol dependence, *Arch Gen Psychiatry*, 53 (1996) 673-80.
- [446] Satoh, S., Kimura, T., Toda, M., Miyazaki, H., Ono, S., Narita, H., Murayama, T. and Nomura, Y., NO donors stimulate noradrenaline release from rat hippocampus in a calmodulin-dependent manner in the presence of L-cysteine, *J Cell Physiol*, 169 (1996) 87-96.
- [447] Satoh, S., Murayama, T. and Nomura, Y., Sodium nitroprusside stimulates noradrenaline release from rat hippocampal slices in the presence of dithiothreitol, *Brain Res*, 733 (1996) 167-74.
- [448] Saudou, F., Amara, D.A., Dierich, A., LeMeur, M., Ramboz, S., Segu, L., Buhot, M.C. and Hen, R., Enhanced aggressive behavior in mice lacking 5-HT1B receptor, *Science*, 265 (1994) 1875-8.
- [449] Savill, J., Fadok, V., Henson, P. and Haslett, C., Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis, *Immunol Today*, 14 (1993) 131-6.
- [450] Schoffelmeer, A.N., Voorn, P., Jonker, A.J., Wardeh, G., Nestby, P., Vanderschuren, L.J., De Vries, T.J., Mulder, A.H. and Tjon, G.H., Morphine-induced increase in D-1 receptor regulated signal transduction in rat striatal neurons and its facilitation by glucocorticoid receptor activation: possible role in behavioral sensitization, *Neurochem Res*, 21 (1996) 1417-23.
- [451] Schuckit, M.A. and Hesselbrock, V., Alcohol dependence and anxiety disorders: what is the relationship?, *Am J Psychiatry*, 151 (1994) 1723-34.
- [452] Schuckit, M.A., Tipp, J.E., Bergman, M., Reich, W., Hesselbrock, V.M. and Smith, T.L., Comparison of induced and independent major depressive disorders in 2,945 alcoholics, *Am J Psychiatry*, 154 (1997) 948-57.
- [453] Schulte-Hermann, R., Bursch, W. and Grasl-Kraupp, B., Active cell death (apoptosis) in liver biology and disease, *Prog Liver Dis*, 13 (1995) 1-35.
- [454] Schulze-Osthoff, K., Walczak, H., Droge, W. and Krammer, P.H., Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis, *J Cell Biol*, 127 (1994) 15-20.
- [455] Schwall, R.H., Robbins, K., Jardieu, P., Chang, L., Lai, C. and Terrell, T.G., Activin induces cell death in hepatocytes in vivo and in vitro, *Hepatology*, 18 (1993) 347-56.
- [456] Segovia, G., Porras, A. and Mora, F., Effects of a nitric oxide donor on glutamate and GABA release in striatum and hippocampus of the conscious rat, *Neuroreport*, 5 (1994) 1937-40.
- [457] Self, D.W., Barnhart, W.J., Lehman, D.A. and Nestler, E.J., Opposite modulation of cocaine-seeking behavior by D1- and D2-like dopamine receptor agonists, *Science*, 271 (1996) 1586-9.

## RÉFÉRENCES

- [458] Self, D.W. and Nestler, E.J., Molecular mechanisms of drug reinforcement and addiction, *Annu Rev Neurosci*, 18 (1995) 463-95.
- [459] Shaham, Y., Funk, D., Erb, S., Brown, T.J., Walker, C.D. and Stewart, J., Corticotropin-releasing factor, but not corticosterone, is involved in stress-induced relapse to heroin-seeking in rats, *J Neurosci*, 17 (1997) 2605-14.
- [460] Shaham, Y., Rajabi, H. and Stewart, J., Relapse to heroin-seeking in rats under opioid maintenance: the effects of stress, heroin priming, and withdrawal, *J Neurosci*, 16 (1996) 1957-63.
- [461] Sharma, S.K., Nirenberg, M. and Klee, W.A., Morphine receptors as regulators of adenylate cyclase activity, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72 (1975) 590-4.
- [462] Shen, W., Kamendulis, L.M., Ray, S.D. and Corcoran, G.B., Acetaminophen-induced cytotoxicity in cultured mouse hepatocytes: effects of Ca(2+)-endonuclease, DNA repair, and glutathione depletion inhibitors on DNA fragmentation and cell death, *Toxicol Appl Pharmacol*, 112 (1992) 32-40.
- [463] Shinagawa, T., Yoshioka, K., Kakumu, S., Wakita, T., Ishikawa, T., Itoh, Y. and Takayanagi, M., Apoptosis in cultured rat hepatocytes: the effects of tumour necrosis factor alpha and interferon gamma, *J Pathol*, 165 (1991) 247-53.
- [464] Shizgal, P., Neural basis of utility estimation, *Curr Opin Neurobiol*, 7 (1997) 198-208.
- [465] Shuster, L., Pharmacogenetics of drugs of abuse, *Ann N Y Acad Sci*, 562 (1989) 56-73.
- [466] Siegers, Modifiers of metabolic toxication and detoxication. In B.T.D. Perrissoud (Ed.), *Liver drugs from experimental pharmacology to therapeutic application*, CRC Press, Boca Raton, 1988, pp. 15-25.
- [467] Sies, H. and de Groot, H., Role of reactive oxygen species in cell toxicity, *Toxicol Lett*, 64-65 Spec No (1992) 547-51.
- [468] Silvia, C.P., King, G.R., Lee, T.H., Xue, Z.Y., Caron, M.G. and Ellinwood, E.H., Intranigral administration of D2 dopamine receptor antisense oligodeoxynucleotides establishes a role for nigrostriatal D2 autoreceptors in the motor actions of cocaine, *Mol Pharmacol*, 46 (1994) 51-7.
- [469] Sim, L.J., Selley, D.E., Dworkin, S.I. and Childers, S.R., Effects of chronic morphine administration on mu opioid receptor-stimulated [35S]GTPgammaS autoradiography in rat brain, *J Neurosci*, 16 (1996) 2684-92.
- [470] Sitland-Marken, P.A., Wells, B.G., Froemming, J.H., Chu, C.C. and Brown, C.S., Psychiatric applications of bromocriptine therapy, *J Clin Psychiatry*, 51 (1990) 68-82.
- [471] Sklair-Tavron, L., Shi, W.X., Lane, S.B., Harris, H.W., Bunney, B.S. and Nestler, E.J., Chronic morphine induces visible changes in the morphology of mesolimbic dopamine neurons, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 (1996) 11202-7.
- [472] Smets, L.A., Programmed cell death (apoptosis) and response to anti-cancer drugs, *Anticancer Drugs*, 5 (1994) 3-9.
- [473] Smith, M., Genetics of human alcohol and aldehyde dehydrogenases, *Adv Hum Genet*, 15 (1986) 249-90.
- [474] Smolen, A. and Marks, M.J., Genetic selections for nicotine and cocaine sensitivity in mice, *J Addict Dis*, 10 (1991) 7-28.

## RÉFÉRENCES

- [475] Snyder, S.H., Nitric oxide: first in a new class of neurotransmitters, *Science*, 257 (1992) 494-6.
- [476] Snyder, S.H. and Brecht, D.S., Nitric oxide as a neuronal messenger, *Trends Pharmacol Sci*, 12 (1991) 125-8.
- [477] Snyder, S.H. and Brecht, D.S., Biological roles of nitric oxide, *Sci Am*, 266 (1992) 68-71, 74-7.
- [478] Sora, I., Takahashi, N., Funada, M., Ujike, H., Revay, R.S., Donovan, D.M., Miner, L.L. and Uhl, G.R., Opiate receptor knockout mice define mu receptor roles in endogenous nociceptive responses and morphine-induced analgesia, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (1997) 1544-9.
- [479] Spanagel, B., Stohr, T., Barden, N. and Holsboer, F., Morphine-induced locomotor and neurochemical stimulation is enhanced in transgenic mice with impaired glucocorticoid receptor function, *J Neuroendocrinol*, 8 (1996) 93-7.
- [480] Spangler, R., Ho, A., Zhou, Y., Maggos, C.E., Yuferov, V. and Kreek, M.J., Regulation of kappa opioid receptor mRNA in the rat brain by 'binge' pattern cocaine administration and correlation with preprodynorphin mRNA, *Brain Res Mol Brain Res*, 38 (1996) 71-6.
- [481] Squadrito, F., Calapai, G., Cucinotta, D., Altavilla, D., Zingarelli, B., Iocolano, M., Urna, G., Sardella, A., Campo, G.M. and Caputi, A.P., Anorectic activity of NG-nitro-L-arginine, an inhibitor of brain nitric oxide synthase, in obese Zucker rats, *Eur J Pharmacol*, 230 (1993) 125-8.
- [482] Stamler, J.S., Simon, D.I., Osborne, J.A., Mullins, M.E., Jaraki, O., Michel, T., Singel, D.J. and Loscalzo, J., S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89 (1992) 444-8.
- [483] Steinberg, R., Souilhac, J., Rodier, D., Alonso, R., Emonds-Alt, X., Le Fur, G. and Soubrie, P., Facilitation of striatal acetylcholine release by dopamine D1 receptor stimulation: involvement of enhanced nitric oxide production via neurokinin-2 receptor activation, *Neuroscience*, 84 (1998) 511-8.
- [484] Steketee, J.D., Striplin, C.D., Murray, T.F. and Kalivas, P.W., Possible role for G-proteins in behavioral sensitization to cocaine, *Brain Res*, 545 (1991) 287-91.
- [485] Sternini, C., Spann, M., Anton, B., Keith, D.E., Jr., Bunnett, N.W., von Zastrow, M., Evans, C. and Brecha, N.C., Agonist-selective endocytosis of mu opioid receptor by neurons in vivo, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 (1996) 9241-6.
- [486] Stewart, J., Deschamps, S.E. and Amir, S., Inhibition of nitric oxide synthase does not block the development of sensitization to the behavioral activating effects of amphetamine, *Brain Res*, 641 (1994) 141-4.
- [487] Stewart, T.L., Michel, A.D., Black, M.D. and Humphrey, P.P., Evidence that nitric oxide causes calcium-independent release of [3H] dopamine from rat striatum in vitro, *J Neurochem*, 66 (1996) 131-7.
- [488] Stolerman, I., Drugs of abuse: behavioral principles, methods and terms, *Trends Pharmacol Sci*, 13 (1992) 170-176.
- [489] Stout, A.K. and Woodward, J.J., Mechanism for nitric oxide's enhancement of NMDA-stimulated [3H]norepinephrine release from rat hippocampal slices, *Neuropharmacology*, 34 (1995) 723-9.

## RÉFÉRENCES

- [490] Strasser, A., McCarron, R.M., Ishii, H., Stanimirovic, D. and Spatz, M., L-arginine induces dopamine release from the striatum in vivo, *Neuroreport*, 5 (1994) 2298-300.
- [491] Striplin, C.D. and Kalivas, P.W., Robustness of G protein changes in cocaine sensitization shown with immunoblotting, *Synapse*, 14 (1993) 10-5.
- [492] Suh, H.W., Hudson, P.M., McMillian, M.K., Das, K.P., Wilson, B.C., Wu, G.C. and Hong, J.S., Long-term stimulation of nicotinic receptors is required to increase proenkephalin A mRNA levels and the delayed secretion of [Met5]-enkephalin in bovine adrenal medullary chromaffin cells, *J Pharmacol Exp Ther*, 275 (1995) 1663-70.
- [493] Sun, P., Kanthasamy, A., Yim, G.K. and Isom, G.E., Inhibition of potassium-stimulated dopamine release by the nitric oxide generator isosorbide dinitrate, *Neuropharmacology*, 34 (1995) 205-10.
- [494] Suzuki, T., Tsuji, M., Ikeda, H., Misawa, M., Narita, M. and Tseng, L.F., Antisense oligodeoxynucleotide to delta opioid receptors blocks cocaine-induced place preference in mice, *Life Sci*, 60 (1997) 283-8.
- [495] Takahashi, N., Miner, L.L., Sora, I., Ujike, H., Revay, R.S., Kostic, V., Jackson-Lewis, V., Przedborski, S. and Uhl, G.R., VMAT2 knockout mice: heterozygotes display reduced amphetamine-conditioned reward, enhanced amphetamine locomotion, and enhanced MPTP toxicity, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (1997) 9938-43.
- [496] Tanda, G., Pontieri, F.E. and Di Chiara, G., Cannabinoid and heroin activation of mesolimbic dopamine transmission by a common mu1 opioid receptor mechanism, *Science*, 276 (1997) 2048-50.
- [497] Tao, P.L., Lee, C.R., Law, P.Y. and Loh, H.H., The interaction of the mu-opioid receptor and G protein is altered after chronic morphine treatment in rats, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 348 (1993) 504-8.
- [498] Tayfun Uzbay, I. and Oglesby, M.W., Nitric oxide and substance dependence, *Neurosci Biobehav Rev*, 25 (2001) 43-52.
- [499] Terwilliger, R.Z., Beitner-Johnson, D., Sevarino, K.A., Crain, S.M. and Nestler, E.J., A general role for adaptations in G-proteins and the cyclic AMP system in mediating the chronic actions of morphine and cocaine on neuronal function, *Brain Res*, 548 (1991) 100-10.
- [500] Terwilliger, R.Z., Ortiz, J., Guitart, X. and Nestler, E.J., Chronic morphine administration increases beta-adrenergic receptor kinase (beta ARK) levels in the rat locus coeruleus, *J Neurochem*, 63 (1994) 1983-6.
- [501] Thiele, T.E., van Dijk, G. and Bernstein, I.L., Ethanol-induced c-Fos expression in rat lines selected for low and high alcohol consumption, *Brain Res*, 756 (1997) 278-82.
- [502] Thomas, J.D., Weinert, S.P., Sharif, S. and Riley, E.P., MK-801 administration during ethanol withdrawal in neonatal rat pups attenuates ethanol-induced behavioral deficits, *Alcohol Clin Exp Res*, 21 (1997) 1218-25.
- [503] Thomas, M.P., Monaghan, D.T. and Morrisett, R.A., Evidence for a causative role of N-methyl-D-aspartate receptors in an in vitro model of alcohol withdrawal hyperexcitability, *J Pharmacol Exp Ther*, 287 (1998) 87-97.
- [504] Tolliver, B.K., Belknap, J.K., Woods, W.E. and Carney, J.M., Genetic analysis of sensitization and tolerance to cocaine, *J Pharmacol Exp Ther*, 270 (1994) 1230-8.
- [505] Tolliver, B.K., Ho, L.B., Reid, M.S. and Berger, S.P., Evidence for involvement of ventral tegmental area cyclic AMP systems in behavioral sensitization to psychostimulants, *J Pharmacol Exp Ther*, 278 (1996) 411-20.

## RÉFÉRENCES

- [506] Tomei, D.L. and O., C.F., Apoptosis : the molecular basis of cell death., Cild Spring Harbour Laboratory Press, 1991, 321 pp.
- [507] Tooby, J. and Cosmides, L., On the universality of human nature and the uniqueness of the individual: the role of genetics and adaptation, *J Pers*, 58 (1990) 17-67.
- [508] Trillat, A.C., Malagie, I., Searce, K., Pons, D., Anmella, M.C., Jacquot, C., Hen, R. and Gardier, A.M., Regulation of serotonin release in the frontal cortex and ventral hippocampus of homozygous mice lacking 5-HT1B receptors: in vivo microdialysis studies, *J Neurochem*, 69 (1997) 2019-25.
- [509] Trujillo, K.A. and Akil, H., Inhibition of morphine tolerance and dependence by the NMDA receptor antagonist MK-801, *Science*, 251 (1991) 85-7.
- [510] Trujillo, K.A. and Akil, H., Opiate tolerance and dependence: recent findings and synthesis, *New Biol*, 3 (1991) 915-23.
- [511] Trujillo, K.A. and Akil, H., Inhibition of opiate tolerance by non-competitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonists, *Brain Res*, 633 (1994) 178-88.
- [512] Trump, B.F., Berezesky, I.K., Smith, M.W., Phelps, P.C. and Elliget, K.A., The relationship between cellular ion deregulation and acute and chronic toxicity, *Toxicol Appl Pharmacol*, 97 (1989) 6-22.
- [513] Trzaskowska, E., Krzascik, P., Staniszewska, A., Pucilowski, O. and Kostowski, W., On the relative importance of D-1 vs. D-2 dopaminergic receptors in the control of audiogenic seizures in ethanol withdrawn rats, *Drug Alcohol Depend*, 24 (1989) 265-7.
- [514] Tsai, G., Gastfriend, D.R. and Coyle, J.T., The glutamatergic basis of human alcoholism, *Am J Psychiatry*, 152 (1995) 332-40.
- [515] Tsiens, J.Z., Chen, D.F., Gerber, D., Tom, C., Mercer, E.H., Anderson, D.J., Mayford, M., Kandel, E.R. and Tonegawa, S., Subregion- and cell type-restricted gene knockout in mouse brain, *Cell*, 87 (1996) 1317-26.
- [516] Tsokos-Kuhn, J.O., Hughes, H., Smith, C.V. and Mitchell, J.R., Alkylation of the liver plasma membrane and inhibition of the Ca<sup>2+</sup> ATPase by acetaminophen, *Biochem Pharmacol*, 37 (1988) 2125-31.
- [517] Turgeon, S.M., Pollack, A.E. and Fink, J.S., Enhanced CREB phosphorylation and changes in c-Fos and FRA expression in striatum accompany amphetamine sensitization. f, *Brain Res*, 749 (1997) 120-6.
- [518] Uhl, G.R., Elmer, G.I., LaBuda, M.C. and Pickens, R.W., Genetic influences in drug abuse. In K. Bloom F.E, D.J. (Ed.), *Psychopharmacology : The Fourth Generation of Progress*, Raven Press, New York, 1995, pp. 1793-1806.
- [519] Uhl, G.R., Gold, L.H. and Risch, N., Genetic analyses of complex behavioral disorders, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (1997) 2785-6.
- [520] Uhl, G.R., Vandenbergh, D.J. and Miner, L.L., Knockout mice and dirty drugs. Drug addiction, *Curr Biol*, 6 (1996) 935-6.
- [521] Unterwald, E.M., Fillmore, J. and Kreek, M.J., Chronic repeated cocaine administration increases dopamine D1 receptor-mediated signal transduction, *Eur J Pharmacol*, 318 (1996) 31-5.

## **RÉFÉRENCES**

- [522] Uzbay, I.T., Akarsu, E.S. and Kayaalp, S.O., Effects of bromocriptine and haloperidol on ethanol withdrawal syndrome in rats, *Pharmacol Biochem Behav*, 49 (1994) 969-74.
- [523] Uzbay, I.T., Erden, B.F., Tapanyigit, E.E. and Kayaalp, S.O., Nitric oxide synthase inhibition attenuates signs of ethanol withdrawal in rats, *Life Sci*, 61 (1997) 2197-209.
- [524] Uzbay, I.T., Grewal, J.S., Wallis, C.J., Dungan, L.F. and Lal, H., Nitric oxide synthase inhibition attenuates saccharin or ethanol reinforced responding in Long-Evans rats, *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiat*, 22 (1998) 1411-1423.
- [525] Uzbay, I.T., Usanmaz, S.E., Tapanyigit, E.E., Aynacioglu, S. and Akarsu, E.S., Dopaminergic and serotonergic alterations in the rat brain during ethanol withdrawal: association with behavioral signs, *Drug Alcohol Depend*, 53 (1998) 39-47.
- [526] Uzbay, I.T., Yesilyurt, O., Celik, T., Ergun, H. and Isimer, A., Effects of agmatine on ethanol withdrawal syndrome in rats, *Behav Brain Res*, 107 (2000) 153-9.
- [527] Valverde, O., Tzavara, E., Hanoune, J., Roques, B.P. and Maldonado, R., Protein kinases in the rat nucleus accumbens are involved in the aversive component of opiate withdrawal, *Eur J Neurosci*, 8 (1996) 2671-8.
- [528] Van Vliet, B.J., Van Rijswijk, A.L., Wardeh, G., Mulder, A.H. and Schoffelmeer, A.N., Adaptive changes in the number of Gs- and Gi-proteins underlie adenylyl cyclase sensitization in morphine-treated rat striatal neurons, *Eur J Pharmacol*, 245 (1993) 23-9.
- [529] Vassiljev, V., Kalda, A., Pokk, P., Vali, M. and Zharkovsky, A., The effects of the nitric oxide synthase inhibitor 7-nitroindazole on ethanol pharmacokinetics in rats after acute and chronic ethanol administration, *Alcohol Alcohol*, 33 (1998) 609-15.
- [530] Vaupel, D.B., Kimes, A.S. and London, E.D., Comparison of 7-nitroindazole with other nitric oxide synthase inhibitors as attenuators of opioid withdrawal, *Psychopharmacology (Berl)*, 118 (1995) 361-8.
- [531] Vaupel, D.B., Kimes, A.S. and London, E.D., Nitric oxide synthase inhibitors. Preclinical studies of potential use for treatment of opioid withdrawal, *Neuropsychopharmacology*, 13 (1995) 315-22.
- [532] Vaupel, D.B., Kimes, A.S. and London, E.D., Further in vivo studies on attenuating morphine withdrawal: isoform-selective nitric oxide synthase inhibitors differ in efficacy, *Eur J Pharmacol*, 324 (1997) 11-20.
- [533] Ventayol, P., Busquets, X. and Garcia-Sevilla, J.A., Modulation of immunoreactive protein kinase C-alpha and beta isoforms and G proteins by acute and chronic treatments with morphine and other opiate drugs in rat brain, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 355 (1997) 491-500.
- [534] Volpicelli, J.R., Alterman, A.I., Hayashida, M. and O'Brien, C.P., Naltrexone in the treatment of alcohol dependence, *Arch Gen Psychiatry*, 49 (1992) 876-80.
- [535] Walker, R.J., Brooks, H.L. and Holden-Dye, L., Evolution and overview of classical transmitter molecules and their receptors, *Parasitology*, 113 (1996) S3-33.
- [536] Wang, H.Q., Kampine, J.P. and Tseng, L.F., Antisense oligodeoxynucleotide to a delta-opioid receptor messenger RNA selectively blocks the antinociception induced by intracerebroventricularly administered delta-, but not mu-, epsilon- or kappa-opioid receptor agonists in the mouse, *Neuroscience*, 75 (1996) 445-52.



## RÉFÉRENCES

- [537] Wehner, J.M. and Bowers, B.J., Use of transgenics, null mutants, and antisense approaches to study ethanol's actions, *Alcohol Clin Exp Res*, 19 (1995) 811-20.
- [538] Weinberg, E.D., Iron withholding: a defense against infection and neoplasia, *Physiol Rev*, 64 (1984) 65-102.
- [539] Weiss, F., Parsons, L.H., Schulteis, G., Hyytia, P., Lorang, M.T., Bloom, F.E. and Koob, G.F., Ethanol self-administration restores withdrawal-associated deficiencies in accumbal dopamine and 5-hydroxytryptamine release in dependent rats, *J Neurosci*, 16 (1996) 3474-85.
- [540] Werling, L.L., McMahon, P.N. and Cox, B.M., Selective changes in mu opioid receptor properties induced by chronic morphine exposure, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86 (1989) 6393-7.
- [541] White, F.J., Hu, X.T. and Zhang, X.F., Neuroadaptations in nucleus accumbens neurons resulting from repeated cocaine administration, *Adv Pharmacol*, 42 (1998) 1006-9.
- [542] White, F.J., Hu, X.T., Zhang, X.F. and Wolf, M.E., Repeated administration of cocaine or amphetamine alters neuronal responses to glutamate in the mesoaccumbens dopamine system, *J Pharmacol Exp Ther*, 273 (1995) 445-54.
- [543] Widnell, K.L., Self, D.W., Lane, S.B., Russell, D.S., Vaidya, V.A., Miserendino, M.J., Rubin, C.S., Duman, R.S. and Nestler, E.J., Regulation of CREB expression: in vivo evidence for a functional role in morphine action in the nucleus accumbens, *J Pharmacol Exp Ther*, 276 (1996) 306-15.
- [544] Wikler, A., Dynamics of drug dependence. Implications of a conditioning theory for research and treatment, *Arch Gen Psychiatry*, 28 (1973) 611-6.
- [545] Williams, G.C. and Nesse, R.M., The dawn of Darwinian medicine, *Q Rev Biol*, 66 (1991) 1-22.
- [546] Williams, G.T. and Smith, C.A., Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death, *Cell*, 74 (1993) 777-9.
- [547] Wilson, E.O., *Sociobiology*, Harvard Univ. Press, Cambridge, MA, 1975.
- [548] Wise, R. and Bozarth, M., A psychomotor stimulant theory of addiction., *Psychol Rev*, 94 (1987) 469-497.
- [549] Wise, R.A., Addictive drugs and brain stimulation reward, *Annu Rev Neurosci*, 19 (1996) 319-40.
- [550] Wise, R.A., Neurobiology of addiction, *Curr Opin Neurobiol*, 6 (1996) 243-51.
- [551] Woody, G.E., McLellan, A.T. and O'Brien, C.P., Treatment of behavioral and psychiatric problems associated with opiate dependence, *NIDA Res Monogr*, 46 (1984) 23-35.
- [552] Woolverton, W.L. and Johnson, K.M., Neurobiology of cocaine abuse, *Trends Pharmacol Sci*, 13 (1992) 193-200.
- [553] Wyllie, A.H., Kerr, J.F. and Currie, A.R., Cell death: the significance of apoptosis, *Int Rev Cytol*, 68 (1980) 251-306.
- [554] Xu, M., Hu, X.T., Cooper, D.C., Moratalla, R., Graybiel, A.M., White, F.J. and Tonegawa, S., Elimination of cocaine-induced hyperactivity and dopamine-mediated neurophysiological effects in dopamine D1 receptor mutant mice, *Cell*, 79 (1994) 945-55.

## RÉFÉRENCES

- [555] Xu, M., Koeltzow, T.E., Santiago, G.T., Moratalla, R., Cooper, D.C., Hu, X.T., White, N.M., Graybiel, A.M., White, F.J. and Tonegawa, S., Dopamine D3 receptor mutant mice exhibit increased behavioral sensitivity to concurrent stimulation of D1 and D2 receptors, *Neuron*, 19 (1997) 837-48.
- [556] Yamada, K., Noda, Y., Nakayama, S., Komori, Y., Sugihara, H., Hasegawa, T. and Nabeshima, T., Role of nitric oxide in learning and memory and in monoamine metabolism in the rat brain, *Br J Pharmacol*, 115 (1995) 852-8.
- [557] Yin, J.C. and Tully, T., CREB and the formation of long-term memory, *Curr Opin Neurobiol*, 6 (1996) 264-8.
- [558] Yonish-Rouach, E., Resnitzky, D., Lotem, J., Sachs, L., Kimchi, A. and Oren, M., Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6, *Nature*, 352 (1991) 345-7.
- [559] Zajonc, R.B., Emotion and facial efference: a theory reclaimed, *Science*, 228 (1985) 15-21.
- [560] Zamanillo, D., Casanova, E., Alonso-Llamazares, A., Ovalle, S., Chinchetru, M.A. and Calvo, P., Identification of a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase phosphorylation site in the carboxy terminal tail of human D1 dopamine receptor, *Neurosci Lett*, 188 (1995) 183-6.
- [561] Zernig, G., Fabisch, K. and Fabisch, H., Pharmacotherapy of alcohol dependence, *Trends Pharmacol Sci*, 18 (1997) 229-31.
- [562] Zhang, L., Yu, Y., Mackin, S., Weight, F.F., Uhl, G.R. and Wang, J.B., Differential mu opiate receptor phosphorylation and desensitization induced by agonists and phorbol esters, *J Biol Chem*, 271 (1996) 11449-54.
- [563] Zhang, X.F., Hu, X.T., White, F.J. and Wolf, M.E., Increased responsiveness of ventral tegmental area dopamine neurons to glutamate after repeated administration of cocaine or amphetamine is transient and selectively involves AMPA receptors, *J Pharmacol Exp Ther*, 281 (1997) 699-706.
- [564] Zhou, Q.Y. and Palmiter, R.D., Dopamine-deficient mice are severely hypoactive, adipsic, and aphagic, *Cell*, 83 (1995) 1197-209.
- [565] Zhou, Q.Y., Quaife, C.J. and Palmiter, R.D., Targeted disruption of the tyrosine hydroxylase gene reveals that catecholamines are required for mouse fetal development, *Nature*, 374 (1995) 640-3.
- [566] Zhu, X. and Luo, L., Effect of nitroprusside (nitric oxide) on endogenous dopamine release from rat striatal slices, *J. Neurochem*, 59 (1992) 932-935.
- [567] Zimmerman, H.J. (Ed.), *Hepatotoxicity : The adverse effect of drugs and other chemicals on the liver*, New York, 1978.
- [568] Zimmerman, H.J. and Ishakk, G. (Eds.), *Pathology of the liver, Hepatic injury due to drugs and toxins*, Edinburgh, Churchill Livingstone, 1979, 335-386 pp.
- [569] Zoli, M., Picciotto, M.R., Ferrari, R., Cocchi, D. and Changeux, J.P., Increased neurodegeneration during ageing in mice lacking high-affinity nicotine receptors, *Embo J*, 18 (1999) 1235-1244.

## **VOLUME II : RESULTATS EXPERIMENTAUX**

**CHAPITRE I : SYNTHÈSES CHIMIQUES, PRÉSENTATION ET DISCUSSION**

**CHAPITRE II : PUBLICATIONS, PRÉSENTATION ET DISCUSSION**

**CHAPITRE III : LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LE RENFORCEMENT DES STIMULATIONS STRESSANTES ET ANTI-STRESSANTES**

**CHAPITRE IV : LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LA LIBÉRATION DES NEUROMÉDIATEURS**

**CHAPITRE V : MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON**

**A- Cross talk entre les effets de la nicotine et de la cotinine sur les mécanismes de la récompense.**

**B- Effets de l'administration et du retrait de la nicotine et de la cotinine sur l'analgésie, la prise de poids et l'activité openfield.**

**C- Dit NO à la cotinine.**

**DISCUSSION GÉNÉRALE**

**CONCLUSION GÉNÉRALE**

**MATÉRIEL ET MÉTHODES : GÉNÉRALITÉS**

**RÉFÉRENCES**

**ANNEXE : PUBLICATIONS**

Riah O, Dousset JC, Courriere P, Baziard-Mouysset G, Ecalte R (1997) Synthesis of cotinine and cotinine N-oxide : evaluation of their interaction with nicotine in the insecticidal activity. Nat Prod Lett 11:37-45.

Riah O, Dousset JC, Courriere P, Stigliani JL, Baziard-Mouysset G, Belahsen Y (1999) Evidence that nicotine acetylcholine receptors are not the main targets of cotinine toxicity. Toxicol Lett 109:21-29.

Riah O, Courriere P, Dousset JC, Todeschi N, Labat C (1998) Nicotine is more efficient than cotinine at passing the blood-brain barrier in rats. Cell Mol Neurobiol 18:311-318.

Riah O, Dousset JC, Bofill-Cardona E, Courriere P (2000) Isolation and microsequencing of a novel cotinine receptor. Cell Mol Neurobiol 20:653-664.

## VOLUME II : RESULTATS EXPERIMENTAUX

### *FIGURES*

**Figure** 10. Schéma général de synthèse de la cotinine et de la N-oxyde de cotinine

**Figure** 11. Constantes physico-chimiques et analyse spectrale de la nicotine

**Figure** 12. Constantes physico-chimiques et analyse spectrale de la dibromo cotinine bromohydrate perbromure

**Figure** 13. Constantes physico-chimiques et analyse spectrale de la dibromo cotinine bromohydrate

**Figure** 14. Constantes physico-chimiques et analyse spectrale de la dibromo cotinine

**Figure** 15. Constantes physico-chimiques et analyse spectrale de la cotinine

**Figure** 16. Constantes physico-chimiques et analyse spectrale de la N-oxyde de cotinine

**Figure** 17. Constantes physico-chimiques et analyse spectrale de la N,n-propyl carboxamide de cotinine

**Figure** 18. Schéma de synthèse du gel d'affinité

**Figure** 19. Modélisation de la nicotine et de la cotinine

**Figure** 20. Analyse et sensibilité du dosage par HPLC de la cotinine endogène

**Figure** 21. Présence dans le cerveau et absence dans l'aorte du doublet p40 chez le rongeur naïf

**Figure** 22. Identité des profils par HPLC des produits de digestion, par la trypsine, de La p40H et de la p40L cérébrales

**Figure** 23. La cotinine précipite l'effet stimulant du stress de l'administration saline isotonique sur l'ancrage de la p40 dans les membranes cérébrales

**Figure** 24. Opposition des effets de l'administration répétée de la solution saline isotonique seule ou avec la nicotine sur les sites récepteurs de la cotinine du cortex et réversion des effets de la nicotine par la cotinine

**Figure** 25. La cotinine renforce, par un mécanisme additif, l'effet du stress de la Solution saline isotonique et, par mécanisme synergique (potentialisation), de l'effet anti-stress de la nicotine sur la p40H

**Figure** 26. Effet additif de l'administration répétée de la solution saline isotonique, de la cotinine et de la nicotine sur l'ancrage de la p40H cérébrale

**Figure** 27. Comparaison des effets dose réponse de la cotinine sur la libération de la NA et de la DA dans les synaptosomes de cinq régions du cerveau chez le rat

**Figure** 28. Potentialisation des effets de la cotinine sur la libération de DA par la mecamlamine dans le cerveau arrière

## **VOLUME II : RESULTATS EXPERIMENTAUX**

**Figure 29.** Effet dose réponse de la cotinine sur la libération de la DA dans les synaptosomes du striatum chez le rat

**Figure 30.** Blocage avec les antagonistes des nAChRs de la libération de DA des synaptosomes du striatum provoquée par la cotinine

**Figure 31.** Blocage total avec les antip40 de la libération de DA des synaptosomes du striatum provoquée par la cotinine nM

**Figure 32.** Évolution du volume total des solutions (en ml) consommés par groupe de 10 souris au cours (en jours) du pré-test (phase I), du test (phase II) et du test de substitution (phase III)

**Figure 33.** Absence d'effet hypodipsia de la nicotine chez la souris et potentialisation des effets de la nicotine par la cotinine

**Figure 34.** Effets CPP de la cotinine et désensibilisation

**Figure 35.** Effets CPP de la nicotine et absence de désensibilisation et d'influence de la cotinine

**Figure 36.** Constance des effets renforçateurs et aversifs de la cotinine

**Figure 37.** Absence d'effet hypodipsia dans le choix multiple

**Figure 38.** Maintient de l'aversion de la nicotine dans le choix multiple

**Figure 39.** Réversion et potentialisation des effets aversifs de la cotinine

**Figure 40.** La substitution ne produit pas d'effet hypodipsia

**Figure 41.** La nicotine renverse totalement l'effet aversif de la cotinine en effet renforçateur alors que l'inverse est partiellement vrai

**Figure 42.** Modèle conceptuel illustrant les unités majeures impliquées dans les réponses consommatoires et les processus d'attribution en relation avec les stimulants environnementaux de Ikemoto et Panksepp

**Figure 43.** Effets de l'administration de la nicotine et de la cotinine dans l'eau de boisson sur l'analgésie spinale : saturation des effets de la cotinine

**Figure 44.** Effet du retrait et absence d'effet de l'administration continue de la nicotine et de la cotinine sur la prise de poids

**Figure 45.** Évolution de la croissance pondérale au cours de l'administration chronique dans l'eau de boisson des alcaloïdes

**Figure 46.** Analyse de l'effet des alcaloïdes sur la prise de poids

**Figure 47.** Modulation de l'activité motrice émotionnelle

**Figure 48.** Modulation de l'activité motrice

**Figure 49.** Modulation de l'activité exploration distale (rearing)

## **VOLUME II : RESULTATS EXPERIMENTAUX**

**Figure** 50. Modulation de l'activité motrice exploration proximale

**Figure** 51. Modulation des paramètres de l'anxiété

**Figure** 52. Modulation motrice émotionnelle, fortes doses

**Figure** 53. Modulation l'activité motrice

**Figure** 54. Modulation de l'activité exploration distale (rearing)

**Figure** 55. Modulation l'activité exploration proximale

**Figure** 56. Modulation des paramètres de l'anxiété

**Figure** 57. Illustration du cerveau de rat montrant le système mesocorticolimbique

**Figure** 58. Cinétique de la modulation de la peroxydation lipidique par l'administration de la nicotine et de la cotinine dans l'eau de boisson

**Figure** 59. Cinétique de la modulation de la peroxydation lipidique par l'administration de la nicotine et de la cotinine dans l'eau de boisson dans le rein et le foie et par le retrait des alcaloïdes dans le rein

**Figure** 60. Effet à long terme de l'administration des fortes doses des alcaloïdes dans l'eau de boisson sur la peroxydation lipidique

**Figure** 61. Purification de la p40 de l'aorte et étude de son expression par Western blot dans les lignées et tissus humains

**Figure** 62. Image auto-radiographique montrant un gradient d'expression des récepteurs de la cotinine dans le cerveau de rat

**Figure** 63. Régulation de la p40H et de la p40L du cerveau de rat par l'administration de la cotinine dans l'eau de boisson

**Figure** 64. Régulation des nouvelles protéines réceptrices cérébrales clonées par l'administration de la cotinine dans l'eau de boisson chez le rat

**Figure** 65. Régulation des récepteurs centraux de la cotinine par son administration dans l'eau de boisson

**Figure** 66. Estimation, in vitro, de la contribution d'un mécanisme EDRF/NO à l'activité de relaxation de la cotinine et de l'acetylcholine

**Figure** 67. Mécanismes liant le NO, le système cardiovasculaires et le tabagisme

**Figure** 68. Diagramme représentant la spirale du cycle d'addiction de Koob et le Moal

**Figure** 69. Diagramme représentant les points de contrôle de l'homéostasie hédoniste dans la théorie des processus contraire de Solomon et Corbit

## VOLUME II : RESULTATS EXPERIMENTAUX

### TABLEAUX

**Tableau VIII.** Effet du stress de l'administration saline isotonique sur la biodisponibilité de la cotinine : comparaison avec l'administration de la cotinine

**Tableau IX.** Effet de la nicotine et ses antagonistes sur la biodisponibilité de la cotinine

**Tableau X.** Effets opposés de l'administration répétée de la solution saline isotonique seule ou avec la nicotine sur les sites récepteurs de la cotinine : la cotinine renverse les effets de la nicotine dans le cortex et les renforce dans le cervelet

**Tableau XI.** Effet de l'administration répétée de a solution saline isotonique seule ou avec la nicotine sur le rendement par chromatographie d'affinité : renforcement des effets opposés sur la p40H par la cotinine

**Tableau XII.** Effet de l'administration *ad libitum* de la nicotine et de la cotinine dans l'eau comme seule source de boisson sur l'analgésie spinale : saturation des effets de la cotinine

**Tableau XIII.** Taux de croissance (coefficients de régression ou pente) des groupes

**Tableau XIV.** Évolution de la peroxydation lipidique au cours du retrait des alcaloïdes après un mois d'administration dans l'eau de boisson dans cinq tissus de la souris

**Tableaux XV.** Absence d'amplification des p40s par PCR avec les amorces dégénérées

**Tableau XVI.** Stratégies de clonage des récepteurs de la cotinine et clones isolés

### **FIGURES DES ARTICLES PARUS**

#### ARTICLE 1

**Figure 1.** Spectral and chemical analysis of the purity of nicotine derivatives synthesized for use in the insecticidal activity essay

**Figure 2.** Dose response curves of nicotine and cotinine insecticidal activity

**Figure 3.** Analysis of the interaction of nicotine and cotinine in the insecticidal activity in *Lucillia caesar* flies by the method of Steel and Peckham

#### ARTICLE 2

**Figure 1.** Comparison of nicotine and cotinine affinities for subtypes of nAChRs

**Figure 2.** Effects of nicotine and cotinine on mouse growth weight

**Figure 3.** Analysis of nicotine and cotinine toxicity in mice by the method of Steel and Peckham.

#### ARTICLE 3

**Figure 1.** Visualization by TLC of the purity and the ability of cotinine to cross the BBB in rats

**Figure 2.** Visualization and quantification by HPLC analysis of the purity and the ability of cotinine to cross the BBB in rats

## **VOLUME II : RESULTATS EXPERIMENTAUX**

**Figure** 3. Comparison of the efficacy of nicotine and cotinine to cross the BBB in rats

ARTICLE 4

**Figure** 1. Kinetics of the [125I]cotinine binding to rat brain

**Figure** 2. Saturation of high-affinity [125I]cotinine binding sites in rt brain

**Figure** 3. Inhibition of [125I]cotinine binding in rat brain by reference drugs

**Figure** 4. Twelve percent SDS-PAGE visualization of the purity and affinity for reference drug of the p40 of rat brain

### **TABLEAUX DES ARTICLES PARUS**

ARTICLE 1

**Table** 1. Evaluation of relative insecticidal activity of nicotine and derivatives

**Table** 2. Analysis of the nature of nicotine interactions with its derivatives in the insecticidal activity in *Lucillia caesar* flies

**Table** 3. Analysis of the nature of nicotine interactions with its derivatives in the insecticidal activity in *Calliphora vomitoria* flies

ARTICLE 2

**Table** 1. Summary of nicotine (ni) and cotinine (co) affinities and potencies to differentiate subtypes of nAChR sites

**Table** 2. Evaluation of relative acute toxicity of nicotine hydrogen tartrate (ni) and cotinine (co) in male and female mice : comparison with the insecticidal activity

**Table** 3. Effects of hexamethonium (hex) on the time at which the respiratory arrest occurs after nicotine hydrogen tartrate (ni) and cotinine (co) or their mixtures (mix) administration to mice

**Table** 4. Analysis of toxicity of nicotine hydrogen tartrate (ni) and cotinine (co) mixtures by the method of Wadley (1945)

ARTICLE 3

**Table** 1. Dose and time effects on brain and plasma concentration of cotinine in rats

ARTICLE 4

**Table** 1. Partial amino acid sequences of p40 from rat brain



# **SYNTHÈSES CHIMIQUES, PRÉSENTATION ET DISCUSSION**

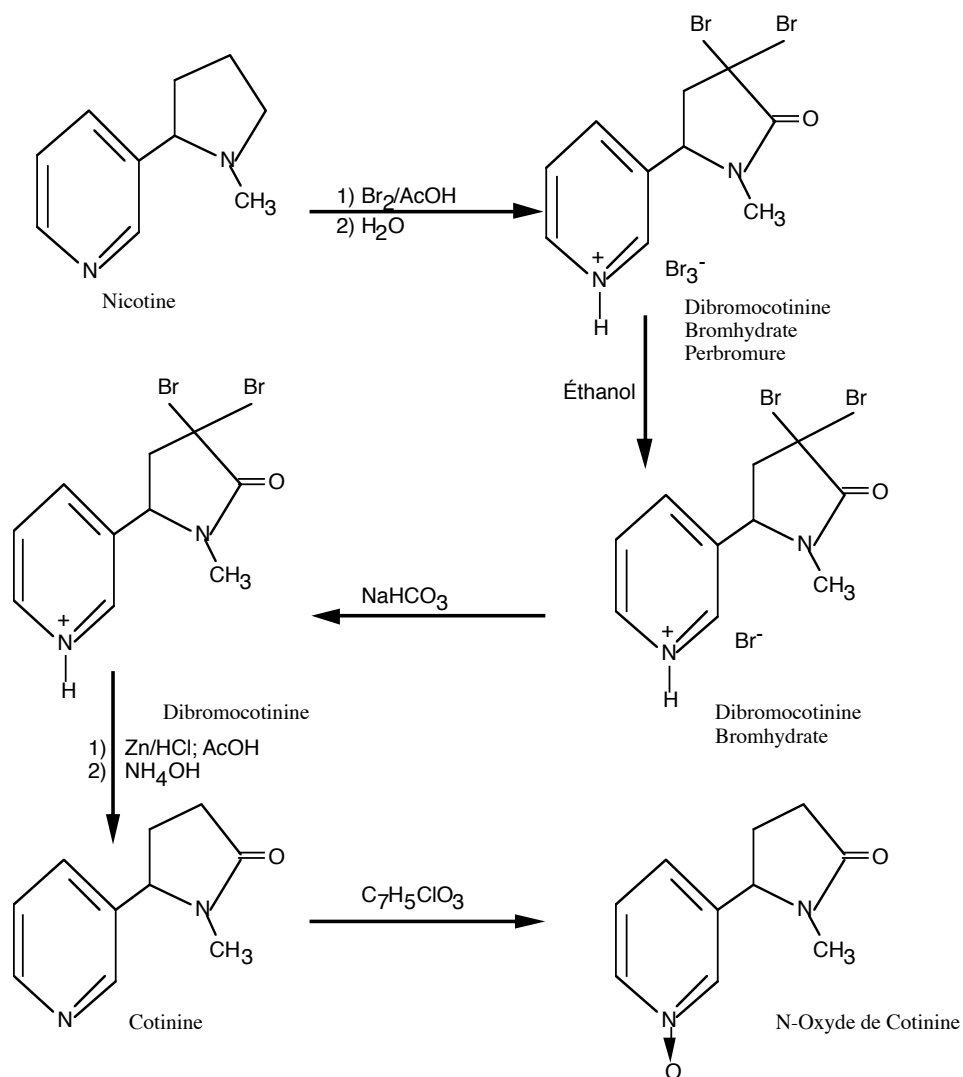
## **CHAPITRE I. SYNTHÈSES CHIMIQUES, PRÉSENTATION ET DISCUSSION.**

## **SYNTHÈSES CHIMIQUES, PRÉSENTATION ET DISCUSSION**

**INTRODUCTION :** La faible toxicité de la cotinine a été rapportée (Dawson et al., 1988). Cependant, la détermination des doses létales et le mode d'interaction avec la nicotine n'ont été rapportés que dans une seule étude sur l'activité insecticide (Bruniquel et al., 1992). Afin de caractériser amplement ces interactions, la synthèse de la cotinine était nécessaire pour disposer de quantités suffisantes et surtout d'une cotinine pure. En effet, certaines des activités de la cotinine commerciale ont été attribuées à des contaminations par la nicotine (Goldberg et al., 1989). De plus, le dérivé N oxyde de cotinine pouvait avoir contribué à l'interaction synergique décrite dans l'étude précédente (Bruniquel et al., 1992). Pour ces raisons, nous avons synthétisé également le dérivé N oxyde de cotinine pour tester ses interactions avec la nicotine.

**MÉTHODES ET RÉSULTATS :** Dans un premier temps, nous avons synthétisé, en partant de la nicotine, la cotinine et la N oxyde de cotinine suivant le schéma général de synthèse présenté (Fig. 10). Nous avons déterminé les points de fusion sur un banc de Köfler, les spectres infra rouge (IR) sur un appareil Perkin Elmer 983G, RMN du  $^1\text{H}$  sur un Bruker à 200 MHz et du  $^{13}\text{C}$  sur un Bruker à 60 MHz. Le Rf et la pureté ont été déterminés en chromatographie sur couche mince CCM sur gel fluorescent de silice 60F254. Le pouvoir rotatoire a été mesuré sur un polarimètre Perkin Elmer 241. Les produits des réactions de synthèse ont été séparés sur gel de silice 60 70-230 Mesh à raison de 30 g de silice par g de produit. Pour l'IR des produits solides, la technique de la pastille de bromure de potassium (KBr) a été utilisée. Les produits liquides ont été passés entre hublots de chlorure de sodium optiquement polis. Pour la RMN, on a utilisé comme solvant le  $\text{CDCl}_3$  ou le DMSO ; le TMS étant la référence interne. Les synthèses ont été réalisées comme décrit pour la cotinine (Bowman and Mckennis, 1963), la N oxyde de cotinine (Dagne and Castagnoli, 1972), la N,n propyl carboxamide de cotinine (Riah, 1996; Riah et al., 2000) et le gel d'affinité (Riah, 1996; Riah et al., 2000).

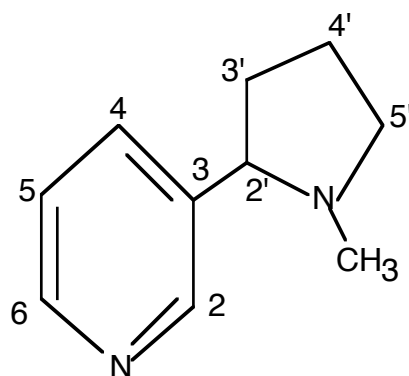
Les propriétés spectrales et physico-chimiques des produits obtenus sont résumées (Fig. 11 à 16).



**Figure 10. Schéma général de synthèse de la cotinine et de la N-oxyde de cotinine.**

Les propriétés physico-chimiques et spectrales des produits obtenus sont conformes aux données de la littérature. Les spectres RMN ont été comparés à ceux de la :

Nicotine	$^1\text{H}$ (Whidby and Seeman, 1976)	$^{13}\text{C}$ (Crain et al., 1971)
Cotinine	$^1\text{H}$ (Dagne and Castagnoli, 1972)	$^{13}\text{C}$ (Crain et al., 1971)
N-Oxyde de Cotinine	$^1\text{H}$ (Dagne and Castagnoli, 1972)	$^{13}\text{C}$ (Crain et al., 1971)



**Nicotine (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>)**

P. M. : 162.23

Rf : 0.46 (méthanol).

**IR** Film (v, cm<sup>-1</sup>) : 2960, 2780(CH, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>) ; 1575, 1425(C=C).

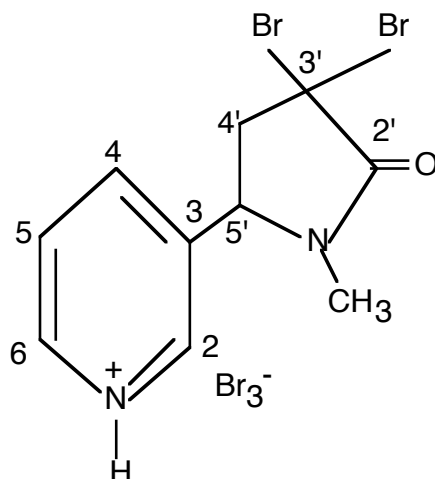
**RMN <sup>1</sup>H**

CDCl<sub>3</sub> (δ, pp m) : 1.59(m, 4H, 2CH<sub>2</sub>) ; 2.14(s, 3H, N-CH<sub>3</sub>) ; 2.27(m, 1H, H<sub>5'</sub>) ; 3.07(faux t, 1H, H<sub>2'</sub>) ; 3.21(m, 1H, H<sub>5'</sub>) ; 7.22(dd, 1H, H<sub>4</sub>, J=4.8 & 8Hz) ; 7.68(m, 1H, H<sub>5</sub>) ; 8.48(dd, 1H, H<sub>6</sub>, J=2 & 4.8Hz) ; 8.56(d, 1H, H<sub>2</sub>, J=2Hz).

**RMN <sup>13</sup>C**

CDCl<sub>3</sub> (δ, ppm) : 22.40(C<sub>4'</sub>, CH<sub>2</sub>) ; 35.01(C<sub>3'</sub>, CH<sub>2</sub>) ; 40.16(N-CH<sub>3</sub>) ; 56.79(C<sub>5'</sub>, CH<sub>2</sub>) ; 68.64(C<sub>2'</sub>, CH) ; 123.34(C<sub>5</sub>, CH) ; 134.61(C<sub>4</sub>, CH) ; 138.55(C<sub>3</sub>, C) ; 148.41(C<sub>6</sub>, CH) ; 149.35(C<sub>2</sub>, CH).

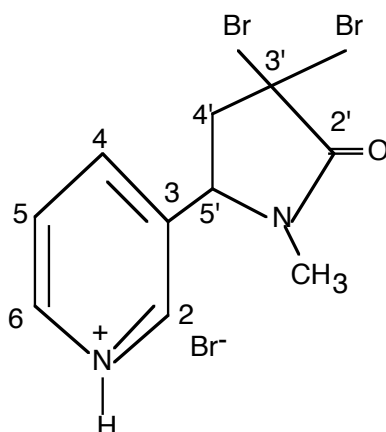
**Figure 11. Constantes physico-chimiques et analyse spectrales du produit de départ nicotine**



**Dibromocotinine Bromhydrate Perbromure (C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>O, Hbr, Br<sub>2</sub>)**

P. M. : 574.708                      Rf : 0.68 (éthanol)                      F = 153-156°C.  
 P = 142.9 g                              R = 92% (brut)  
**IR** KBr (v, cm<sup>-1</sup>) : 3080, 2920(CH, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>) ; 2400-2800(NH+) ; 1680(C=O) ; 1570, 1425(C=C).

**Figure 12. La dibromocotinine bromhydrate perbromure**



**Dibromocotinine Bromhydrate (C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>Br<sub>2</sub>O, Hbr)**

P. M. : 414.9                      Rf : 0.68 (éthanol)                      F = 125-130°C (décomposition).  
 P = 81 g                              R = 72.8% (brut)

**IR**

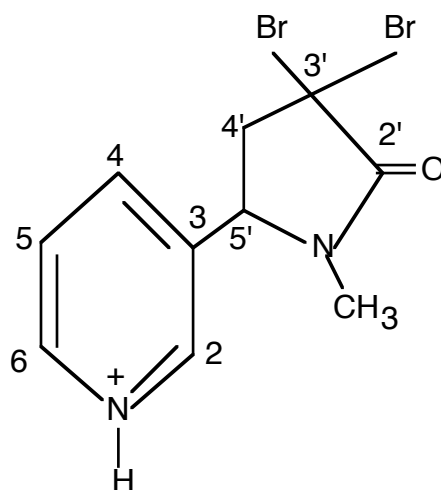
KBr (v, cm<sup>-1</sup>) : 3075(CH) ; 2400-2800(NH+) ; 1710(C=O) ; 1470(C=C).

**RMN <sup>1</sup>H**

DMSO (D<sub>6</sub>) (δ, ppm) : 2.81(s, 3H, N-CH<sub>2</sub>) ; 3.18(dd, 1H, H<sub>4</sub>, J=8 & 16Hz) ; 3.75(dd, 1H, H<sub>4</sub>, J=6 & 16Hz) ; 5.19(m, 1H, H<sub>5</sub>, J=6 & 8Hz) ; 8.22(dd, 1H, H<sub>5</sub>, J=6 & 8Hz) ; 8.75(d, 1H, H<sub>4</sub>, J=8Hz) ; 9.06(d, 1H, H<sub>6</sub>, J=6Hz) ; 9.16(s, 1H, H<sub>2</sub>).

---

**Figure 13. La dibromocotinine bromhydrate**



**Dibromocotinine (C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O)**

P. M. : 334  
P = 40 g

Rf : 0.25 (ACE) ; 0.67 (éthanol).  
R = 51.9%

F = 125°C

**IR**

KBr (v, cm<sup>-1</sup>) : 3040, 2930, 2980(CH, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>) ; 1700(C=O) ; 1470, 1575(C=C).

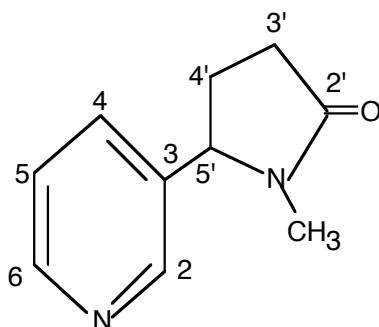
**RMN <sup>1</sup>H**

CDCl<sub>3</sub> (δ, ppm) : 2.75(s, 3H, CH<sub>3</sub>) ; 2.95(dd, 1H, H<sub>4'</sub>, J=8 & 14Hz) ; 3.55(dd, 1H, H<sub>4'</sub>, J=6 & 14Hz) ; 4.67(dd, 1H, H<sub>5'</sub>, J=6 & 8Hz) ; 7.40(dd, 1H, H<sub>5'</sub>, J=5 & 8Hz) ; 7.60(m, 1H, H<sub>4</sub>) ; 8.59(d, 1H, H<sub>2</sub>, J=2Hz) ; 8.67(dd, 1H, H<sub>6</sub>, J=1.5 & 5Hz).

**RMN <sup>13</sup>C**

CDCl<sub>3</sub> (δ, ppm) : 29.51(C, N-CH<sub>3</sub>) ; 53.05(C<sub>3'</sub>, CBr<sub>2</sub>) ; 53.14(C<sub>4'</sub>, CH<sub>2</sub>) ; 59.43(C<sub>5'</sub>, CH) ; 124.04(C<sub>5</sub>, CH) ; 132.16(C<sub>3</sub>, C) ; 134.40(C<sub>4</sub>, CH) ; 148.92(C<sub>6</sub>, CH) ; 150.49(C<sub>2</sub>, CH) ; 168.13(C<sub>2</sub>, C=O).

**Figure 14. La dibromocotinine**



**Cotinine (C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O)**

P. M. : 176.21  
P = 8.21 g

Rf : 0.44 (éthanol)  
R = 61% ; (31.63% nicotine)

[α<sub>D</sub>] = 20.05  
F = 40-42°C

**IR**

KBr (ν, cm<sup>-1</sup>) : 3500-3300(-OH, hygroscopique) ; 1685(C=O) ; 1485 ; 1450(C=C).

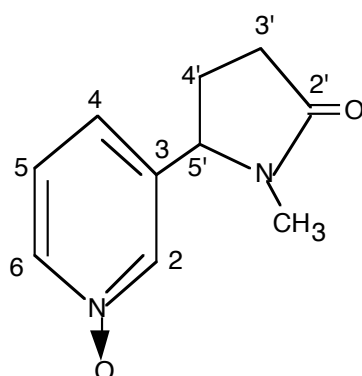
**RMN <sup>1</sup>H**

CDCl<sub>3</sub> (δ, ppm) : 1.91(m, 2H, H<sub>4'</sub>) ; 2.53(m, 2H, H<sub>3'</sub>) ; 2.69(s, 3H, N-CH<sub>3</sub>) ; 4.58(t, 1H, H<sub>5'</sub>, J=6Hz) ; 7.35(dd, 1H, H<sub>5</sub>, J=4.8 & 7.8Hz) ; 7.53(m, 1H, H<sub>4</sub>) ; 8.51(d, 1H, H<sub>2</sub>, J=2.2Hz) ; 8.60(dd, 1H, H<sub>6</sub>, J=1.6 & 4.8Hz).

**RMN <sup>13</sup>C**

CDCl<sub>3</sub> (δ, ppm) : 27.72(N-CH<sub>3</sub> et C<sub>4'</sub>, CH<sub>2</sub>) ; 29.48(C<sub>3'</sub>, CH<sub>2</sub>) ; 61.61(C<sub>5'</sub>, CH) ; 123.53(C<sub>5</sub>, CH) ; 133.32(C<sub>4</sub>, CH) ; 136.08(C<sub>3</sub>, C) ; 147.94(C<sub>6</sub>, CH) ; 149.18(C<sub>2</sub>, CH) ; 174.42(C<sub>2</sub>, C=O).

**Figure 15. La cotinine**



**N-Oxyde de Cotinine (C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

P. M. : 192.21  
P = 0.600 g

Rf : 0.24 (éthanol).  
R = 34.3% ; (5.8% nicotine)

F = 116°C

**IR**

KBr (ν, cm<sup>-1</sup>) : 3420 (-OH, solvant éthanol) ; 1670(C=O) ; 1280(N→O).

**RMN <sup>1</sup>H**

CDCl<sub>3</sub> (δ, pp m) : 1.9(m, 1H, H<sub>4'</sub>) ; 2.54(m, 3H, H<sub>3'</sub>, 1H<sub>4'</sub>) ; 2.73(s, 3H, N-CH<sub>3</sub>) ; 4.48(m, 1H, H<sub>5'</sub>) ; 7.10(m, 1H, H<sub>5</sub>) ; 7.33(m, 1H, H<sub>4</sub>) ; 8.13(m, 1H, H<sub>2</sub>) ; 8.18(m, 1H, H<sub>6</sub>).

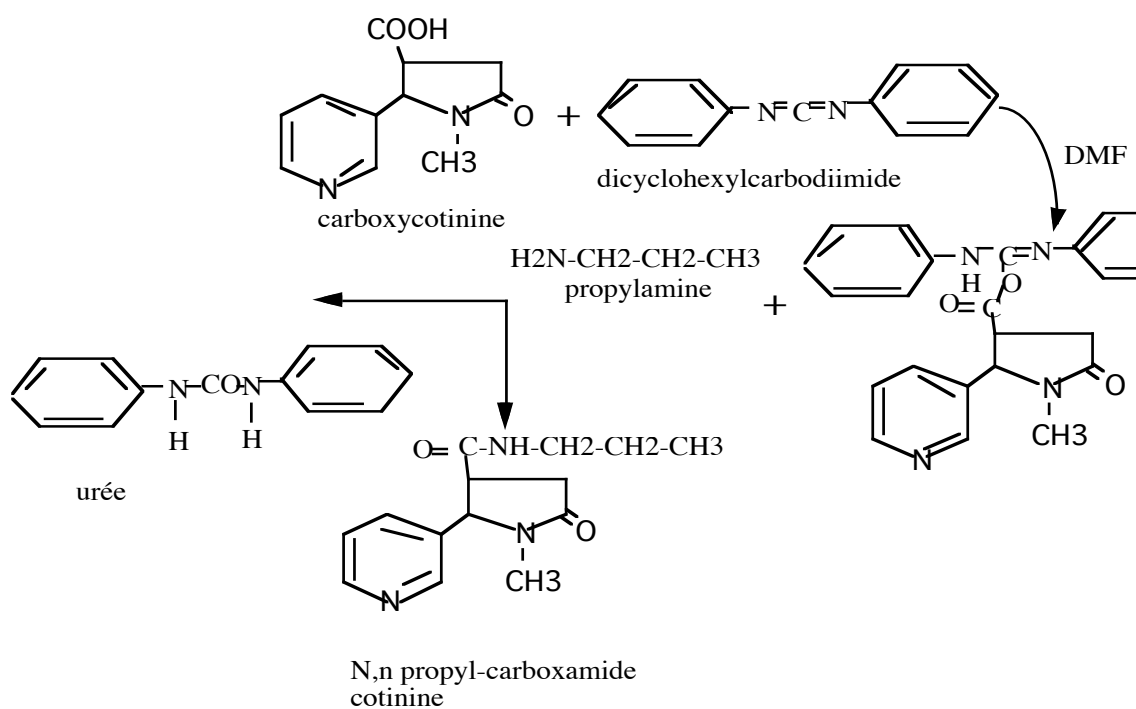
**RMN <sup>13</sup>C**

CDCl<sub>3</sub> (δ, ppm) : 27.53(CH<sub>2</sub>, C<sub>4'</sub>) ; 28.23(CH<sub>3</sub>, N-CH<sub>3</sub>) ; 29.38(C<sub>3'</sub>, CH<sub>2</sub>) ; 61.32(C<sub>5'</sub>, CH) ; 123.35(C<sub>5</sub>, CH) ; 126.39(C<sub>5</sub>, CH) ; 137.53(C<sub>2</sub>, CH) ; 138.57(C<sub>6</sub>, CH) ; 141.03(C<sub>3'</sub>, CH) ; 175.04(C=O).

**Figure 16. La N-oxyde de cotinine**

## SYNTHÈSES CHIMIQUES, PRÉSENTATION ET DISCUSSION

Dans un second temps, nous avons synthétisé la N,n propyl carboxamide de cotinine, par amidification de la carboxycotinine par la propylamine (Fig. 17). Cette structure chimique nous a permis de tester, par inhibition de la liaison de la [125I]-cotinine, la réaction de couplage par amidification de la carboxycotinine avant de synthétiser le gel d'affinité.



### N,n Propyl Carboxamide de Cotinine (C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>O<sub>2</sub>N<sub>3</sub>)

P. M. : 261

R<sub>f</sub> : 0,71

R : 2%

**IR** : Nu jol (v, cm<sup>-1</sup>) : 3110 (-NH-CO- ; fonction amide) ; 1640-1680 (C=O d fonction amide) ; 2900-3000 (groupements -CH alkyls) ; 1580 (-NH).

**RMN <sup>1</sup>H**

CDCl<sub>3</sub> (δ, ppm) : 7-9 (H, du cycle pyrimidine) ; intégration 28 H au lieu de 19.

**RMN <sup>14</sup>C**

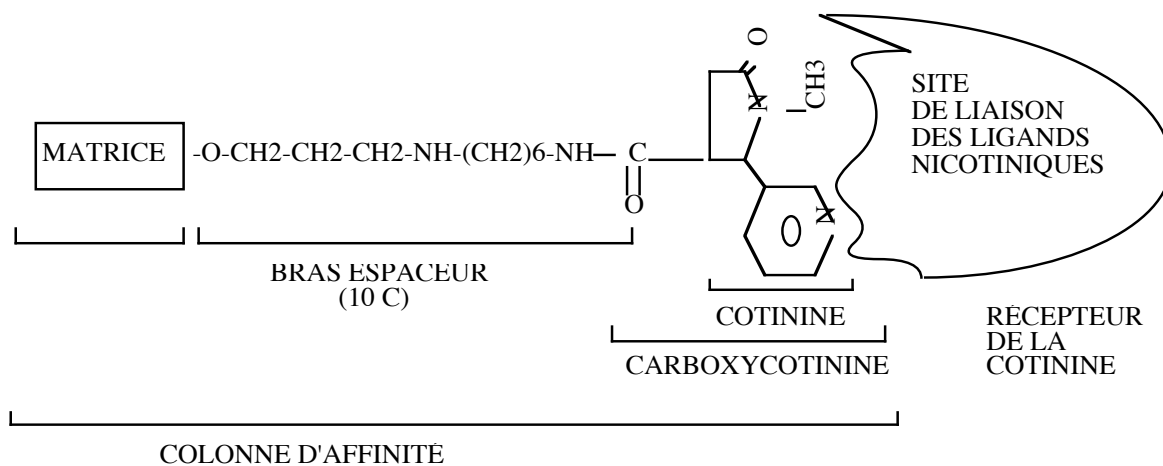
CDCl<sub>3</sub> (δ, ppm) : 16 C au lieu de 14, confirme l'excès de RMN <sup>1</sup>H.

**Figure 17. La N,n propyl carboxamide de cotinine**



## SYNTHÈSES CHIMIQUES, PRÉSENTATION ET DISCUSSION

Dans un troisième temps, nous avons synthétisé le gel d'affinité en couplant la fonction amine du bras espaceur du gel EAH-Sépharose 4-B à la fonction acide de la carboxycotinine, par la même réaction d'amidification. Le gel d'affinité obtenu est illustré (Fig. 18).

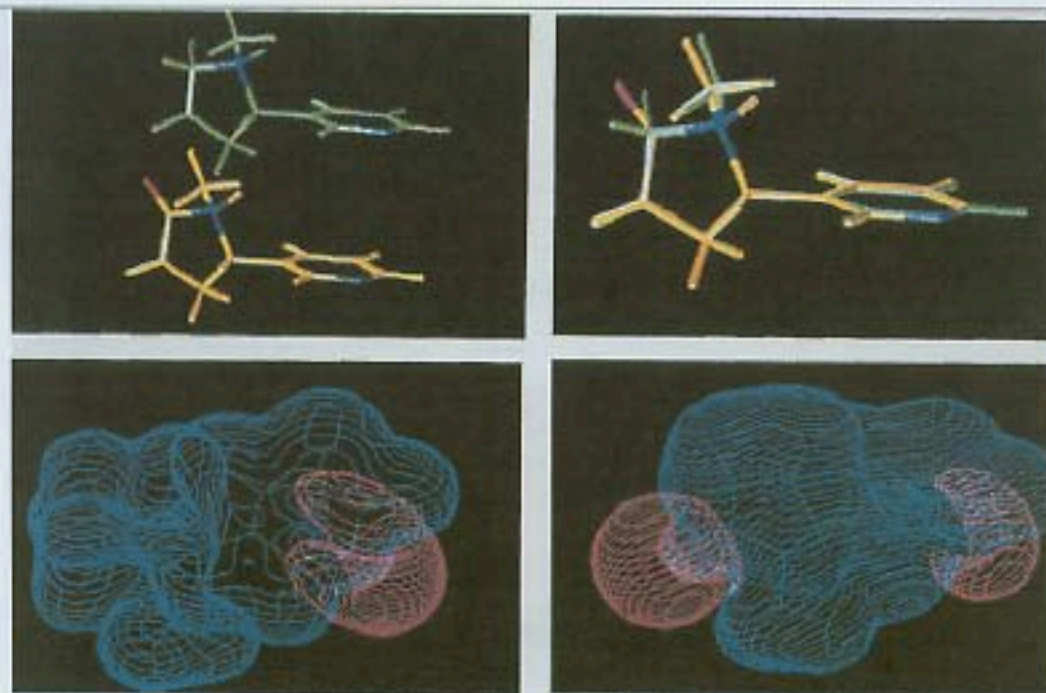


**Figure 18. Schéma de la synthèse du gel d'affinité des récepteurs de la cotinine**

Dans un quatrième temps, nous avons modélisé la structure de la nicotine et de la cotinine a dans le programme MAD (Oxford Molecular, ) et calculé la charge de l'azote de la fonction méthylamine du noyau pyrrolidine et estimer la délocalisation du doublet de l'azote (Fig. 19). Des techniques de mécanique moléculaire– champs de force MM2 (Alinger, 1977)- ont permis d'obtenir et d'analyser les conformations préférées. Celles-ci ont été optimisées par une méthode semi-empirique (Dewar et al., 1985). Pour calculer le potentiel électrostatique moléculaire, les charges atomiques ont été déterminées par une Hamiltonienne AM1. La procédure ZDF (Indiana University, ) a permis de calculer les potentiels électrostatiques moléculaires. Les isolignes ont été tracées dans l'option 3D de MAD. Toutes les simulations ont été réalisées sur ordinateur Silicon Graphics indigo R3000.

NICOTINE (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>)COTININE (C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O)

Mr*.....	162,23	176,21
Ther.....	Sevrage tabac	Stimulant psychomoteur*
Pka.....	8,5	7,5
Coefficient de partage $\otimes$ .....	0,65	3
Constante d'ionisation $\otimes$ .....	8,2	4,4
Concentration cérébrale (ng/ml) $\oplus$ ...40 (à 0,1 mg/kg)		40 (à 1 mg/kg)



\*, Index Merck ;  $\otimes$ , (Li et al., 1992) ;  $\oplus$ , (Riah et al., 1998). Haut : conformation moléculaire (à gauche) de la nicotine en vert et de la cotinine en jaune et superposition des deux molécules (à droite). Bas : isolignes du potentiel électrostatique de la nicotine (à gauche) et de la cotinine (à droite). Code en kcal/mol : bleu = +20 ; rouge = -5. La charge en kcal/mol de l'azote de la méthylamine est plus positive dans la cotinine (+15) que dans la nicotine (+10).

**Figure 19** Modélisation de la nicotine et de la cotinine.

### DISCUSSION

Selon des études sur les mécanismes de la toxicité de la nicotine et ses analogues (Yamamoto et al., 1995; Yamamoto et al., 1998), plus le doublet de l'azote est délocalisé plus la toxicité est faible par rapport à l'activité insecticide. La figure 19 montre que ce doublet est plus délocalisé dans la cotinine (charge +15 Kcal/mol) que dans la nicotine (+10). Par conséquent, la cotinine serait selon ce mécanisme et notre modélisation une structure nicotinique capable d'interagir avec les récepteurs nicotiniques de l'insecte et des mammifères, mais la charge positive limiterait la pénétration dans le système nerveux central (Yamamoto et al., 1995; Yamamoto et al., 1998). Nous avons évalué ces propriétés dans les publications suivantes.

**CHAPITRE II. PUBLICATIONS, PRÉSENTATION ET DISCUSSION.**

## **PUBLICATIONS, PRÉSENTATION ET DISCUSSION**

---

Pour valider le test de l'activité insecticide et les conclusions qui en découlent, la nornicotine, un dérivé de la voie de déméthylation de la nicotine qui agit par les mêmes mécanismes (Dominiak et al., 1985; Risner et al., 1985; Risner et al., 1988; Goldberg et al., 1989; Takada et al., 1989), a été incluse dans notre étude (Riah et al., 1997b). Nous avons également utilisé deux espèces de mouches *Lucilia caesar* et *Caliphora vomitoria* et deux méthodes d'analyse dont les principes sont très différents. La première méthode de Wadley (Wadley, 1945) n'est pas précise, surtout lorsque la réponse étudiée ne donne pas une droite. La deuxième méthode de Steel et Peckham (Steel and Peckham, 1979) est beaucoup plus précise car elle permet de définir les aires d'interaction. Ces aires sont délimitées en se basant sur l'ensemble des points des courbes doses effets (Steel and Peckham, 1979). Les résultats obtenus confirment que les deux alcaloïdes, nicotine et cotinine, interagissent de manière synergique chez les deux espèces de mouches. Cette conclusion est obtenue avec les deux méthodes d'analyse utilisées. Ils permettent également d'exclure une contribution notable du dérivé N oxyde de cotinine dans la synergie. Ils montrent aussi que l'activité insecticide est un test fiable quant à la conclusion sur la synergie, puisque le dérivé nornicotine, en accord avec ses actions identiques à celles de la nicotine (Dominiak et al., 1985; Risner et al., 1985; Risner et al., 1988; Goldberg et al., 1989; Takada et al., 1989), n'est pas un synergiste de l'activité insecticide de la nicotine, mais agit avec celle-ci de manière additive chez *L. c.* ou antagoniste chez *C. v.* Enfin, ils confirment que la cotinine synthétisée est pure (Riah et al., 1997b; Riah et al., 1998b).

Pour tester la synergie chez le mammifère, nous avons étudié les interactions chez la souris *Mus musculus*. Les deux méthodes d'analyse utilisées dans l'activité insecticide ont été conservées et de plus, nous avons analysé la cinétique et la pharmacologie de l'intoxication de la souris par la nicotine et la cotinine. Les résultats obtenus (Riah et al., 1999) confirment que la cotinine est un synergiste de l'intoxication du mammifère par la nicotine. Les résultats

## **PUBLICATIONS, PRÉSENTATION ET DISCUSSION**

---

montrent, en accord avec la modélisation de la nicotine et de la cotinine (Fig. 19) et la théorie de la délocalisation du doublet de l'azote (Yamamoto et al., 1995; Yamamoto et al., 1998), que la cotinine est plus insecticide (< 4 %) que toxique (< 1,5 %). Cependant, l'activité synergique des mélanges n'est pas compatible avec cette théorie. De plus, l'intoxication par la cotinine n'est pas nicotinique. D'une part, les cinétiques de l'intoxication par la nicotine et la cotinine sont différentes et d'autre part et en accord avec la littérature (Barrass et al., 1969), l'héxaméthonium est capable de réduire la toxicité de la nicotine. Cependant, il potentialise la toxicité de la cotinine et il est inactif sur les mélanges de nicotine et de cotinine (Riah et al., 1999). L'administration répétée par voie intra-péritonéale de ces deux alcaloïdes, affecte différemment la prise de poids de la souris en phase de croissance (Riah et al., 1999). Ces effets différents sur la prise de poids suggèrent que les deux alcaloïdes agissent différemment sur les centres nerveux régulant les réactions de stress et l'appétit. En effet, l'administration saline produit un stress (Lukic and Halder, 1993) et la nicotine agit par mobilisation du monoxyde d'azote (NO) des cellules non neuronal (Weruaga et al., 2002). En considérant que la nicotine réduit, l'anxiété, le stress et l'appétit (Clarke, 1987; Pomerleau et al., 1993; Jorenby et al., 1996; Pomerleau et al., 2000; Rada et al., 2001; Jang et al., 2002), que l'appétit augmente au contraire lors du stress (Clarke, 1987; Heinrichs et al., 1992; Wetter et al., 1994), du retrait de la nicotine (Clarke, 1987; Pomerleau et al., 1993; Jorenby et al., 1996; Pomerleau et al., 2000; Rada et al., 2001) et que la privation de nourriture augmente le NO (Borsini et al., 1983; Majeed et al., 1986; Heinrichs et al., 1992; Yamasu et al., 1992; Oluyomi et al., 1994; Kelley et al., 1997; Donny et al., 1998; Jang et al., 2002), la stimulation de la prise de poids par la cotinine (Riah et al., 1999) suppose qu'elle majore l'effet stressant de la solution saline. Nous avons donc évalué *in vitro* son affinité pour les récepteurs de la nicotine de *Torpedo marmorata* et neuronaux du rat (Riah et al., 1999). Les résultats obtenus montrent que son affinité est au moins 100 fois plus faible que celle de la nicotine, pour les sous-types de

## **PUBLICATIONS, PRÉSENTATION ET DISCUSSION**

---

récepteurs marqués par la [<sup>125</sup>I]-alpha-bungarotoxine ou par la [<sup>3</sup>H]-nicotine (Riah et al., 1999). En résumé, les résultats montrent une faible affinité pour les récepteurs de la nicotine et une activité insecticide (<4 %) supérieure à la toxicité (<1,5 %) en accord avec la théorie de la délocalisation du doublet de l'azote (Yamamoto et al., 1995; Yamamoto et al., 1998). Cependant, la cinétique et la pharmacologie de l'intoxication sont différentes de celles de la nicotine et la synergie chez l'insecte (Riah et al., 1997b) et le mammifère (Riah et al., 1999) ne sont pas en accord avec la théorie de la délocalisation du doublet de l'azote, comme mécanisme d'action (Yamamoto et al., 1995; Yamamoto et al., 1998).

La synergie peut s'expliquer par une coopération spatiale, c'est-à-dire l'action ciblée des deux alcaloïdes sur des cellules ou organes différents et / ou moléculaire, c'est-à-dire l'action ciblée des deux alcaloïdes sur des récepteurs différents (Steel and Peckham, 1979). Pour favoriser l'une ou l'autre de ces deux hypothèse, nous avons étudié le passage de la cotinine dans le cerveau du rat vigilant. Nous avons utilisé trois techniques complémentaires, car le passage de la cotinine était controversé. Les trois techniques HPLC, RIA et CCM utilisées démontrent que la cotinine passe dans le cerveau (Riah et al., 1998b). Ce passage exclu donc la coopération spatiale comme mécanisme de l'action synergique des deux alcaloïdes et favorise la notion des récepteurs de la cotinine (Riah, 1996; Riah et al., 1997a; Riah et al., 1997b; Riah et al., 1998b; Riah et al., 1998a; Riah et al., 1999; Riah et al., 2000b; Riah et al., 2000a; Riah et al., 2002). De plus, nous avons discuté l'absence de passage de la cotinine chez le patient humain étudié par Haldin *et al.*, (Halldin et al., 1992) et nous avons proposé la dilution de l'isotope par la cotinine du tabagisme actif ou passif du patient (Riah et al., 1998b).

Pour supporter l'hypothèse des récepteurs de la cotinine, nous avons mis au point l'utilisation d'un radioligand pour étudier les récepteurs de la cotinine (Riah, 1996; Riah et al., 2000b; Riah et al., 2000a) et isolé une protéine candidate pour ce rôle (Riah et al., 2000a). Les

## **PUBLICATIONS, PRÉSENTATION ET DISCUSSION**

---

résultats obtenus montrent un profil pharmacologique mixte, nicotinique et muscarinique, pour cette protéine réceptrice (Riah et al., 2000a). Enfin, la séquence des acides aminés de la protéine purifiée ou p40 n'a montré aucune identité avec les protéines connues mais, une homologie significative avec des protéines humaines, comme la protéine p205 isolées du liquide synovial (Hain et al., 1996) et la p38 isolée des fibroblastes (Bush et al., 1998) et des calculs rénaux (Binette and Binette, 1994). Celles-ci ont été impliquées dans les réactions immunitaires (Hain et al., 1996), inflammatoires (Binette and Binette, 1994; Hain et al., 1996) et la croissance cellulaire (Bush et al., 1998). Cette homologie de séquence et certaines des activités de la cotinine (Smith et al., 1994; Audesirk and Cabell, 1999; Sziraki et al., 1999; Vainio et al., 2000; Riah et al., 1997b; Riah et al., 1999; Riah et al., 2000b; Riah et al., 2002) suggèrent des rôles pour le système cotinine-p40 bien plus importants que prévu jusque là, où le nouveau médiateur NO pourrait trouver toute son expression. Nous avons abordé cette hypothèse dans le modèle expérimental stressant par administration saline (Chapitre III) et dans le modèle de l'administration dans l'eau de boisson (Chapitre V), en passant par l'évaluation *in vitro* du rôle du système cotinine-p40 dans la libération des neuromédiateurs (Chapitre IV).



**LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LE RENFORCEMENT  
DES STIMULATIONS STRESSANTES ET ANTI-STRESSANTES**

**CHAPITRE III. LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS  
LE RENFORCEMENT DES STIMULATIONS STRESSANTES  
ET ANTI-STRESSANTES**

# LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LE RENFORCEMENT DES STIMULATIONS STRESSANTES ET ANTI-STRESSANTES

## **Cotinine and its receptors in reinforcement of stress and anti-stress stimulation's**

### **ABSTRACT.**

**Background** Cotinine, the main derivative of nicotine, is a vasodilator and psycho-stimulant. It was reported to affect alcohol-induced motor incoordination, cocaine- and nicotine-induced dopamine release in the nucleus accumbens and potentialized nicotine effects. Finally, novel proteins or p40 distinct, at the amino acid sequences level, from nicotinic acetylcholine receptors, were implied in its binding.

**Aims** Here, we have evaluated cotinine effects through p40 on the stressing activity of isotonic saline and the anti stressing activity of nicotine.

**Methods & Design** Cotinine was administered with saline or nicotine, extracted from brain and plasma and quantified. Cotinine binding was studied in the brain, p40s were affinity-chromatography isolated, separated by SDS-PAGE and subjected to *in situ* trypsin digestion. They were analyzed by HPLC, Edman degradation and their antibodies were generated in mice to study effects of treatments on their anchorage into brain membranes.

**Results.** In the brain of say-naive rat, cotinine binding was multiple and one doublet of binding proteins, referred hereafter p40H and p40L with respect to their relative molecular weight and affinity for cotinine, was isolated, while in orta of say-naive rabbit, one p40 was isolated. The *in situ* digestion with trypsin of p40H and p40L produced the same HPLC profiles, exception for an intense peak in the p40H. The Edman degradation of p40, p40H and p40L produced the same NH<sub>2</sub>-terminus amino acid sequences. Cotinine was measurable in brain and plasma of say-naive rats and isotonic saline administration decreased its concentrations in brain. By opposition, nicotine (0,1 mg.kg<sup>-1</sup>) administration stimulated brain concentrations of cotinine 1 mg.kg<sup>-1</sup> and inhibited those of cotinine 10 and 70 mg.kg<sup>-1</sup>.

## **LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LE RENFORCEMENT DES STIMULATIONS STRESSANTES ET ANTI-STRESSANTES**

Mecamylamine ( $1 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) showed no effects while hexamethonium ( $1 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) inhibited brain concentrations of cotinine  $70 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Plasma concentrations of cotinine  $70 \text{ mg.kg}^{-1}$  were inhibited by nicotine and hexamethonium. Saline administration stimulated p40 anchorage at 60 min and cotinine reduced the time response to 40 min. Repetitive saline administration stimulated cotinine affinity and had no effect on total binding while nicotine reduced total binding to the low-affinity site. Nicotine effects were antagonized by high doses of cotinine, but mixtures restored the low-affinity site of say-naive treatments. Proteins recovery by affinity-chromatography was stimulated by saline, nicotine and cotinine treatments, while mixture treatments were low active. Recovery of proteins higher than 40 kDa was stimulated by all treatments. P40H recovery was inhibited by cotinine ( $EC_{50} < 1 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) but mixture treatments restored p40H of say-naive treatment. P40L recovery was inhibited by mixture treatments. Recovery of proteins lower than 40 kDa was not affected by any treatment. The Western-blot showed that saline, nicotine, cotinine and their mixtures increased, in addition, p40H anchorage into brain membranes.

**Conclusion.** These results are pharmacokinetic, pharmacodynamic and behavioral supports in favor of cotinine opposites roles in enhancing, by additive mechanism, stressing stimulation and, by potentialized mechanism, anti-stressing stimulation.

**Key words.** nicotine and cotinine interactions; nicotine and cotinine receptors; stress and anti-stress; rodent.

## LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LE RENFORCEMENT DES STIMULATIONS STRESSANTES ET ANTI-STRESSANTES

### **La cotinine et ses récepteurs dans le renforcement des stimulations stressantes et anti-stressantes**

**Donne** La cotinine, le principal dérivé de la nicotine, est un psycho-stimulant et vasodilatateur. Elle a été rapportée affecter l'incordination motrice de l'alcool, la stimulation par la cocaïne et par la nicotine de la libération de dopamine dans le noyau accumbens et potentialiser les effets de la nicotine. Finalement, de nouvelles protéines p40 différentes, à l'échelle de la séquence des acides aminés, des récepteurs nicotiques à l'acétylcholine ont été impliquées dans sa liaison. **But** Ici, nous avons évalué les effets de la cotinine via la p40 sur le renforcement du stress de la solution saline isotonique et de l'anti-stress de la nicotine.

**Méthodes & Conception** La cotinine a été administrée avec la solution saline ou avec la nicotine, extraite du cerveau et du plasma et quantifiée. La liaison de la cotinine a été étudiée dans le cerveau, les protéines p40 isolées par chromatographie d'affinité, séparées par SDS-PAGE et soumises à une digestion *in situ* par la trypsine. Elles ont été analysées par HPLC et la dégradation d'Edman et leurs anticorps ont été générés chez la souris pour étudier l'effet des traitements sur leur ancrage dans les membranes cérébrales. **Résultats** Dans le cerveau de rat dit naïf, la liaison de la cotinine était multiple et un doublet de protéines, rapportées dans la suite p40H et p40L par respect pour leur masse relative et leur affinité pour la cotinine, alors que dans l'aorte de lapin dit naïf une seule p40 a été isolée. La digestion *in situ* avec la trypsine de la p40H et la p40L a produit un profile HPLC identique, à l'exception d'un pic plus intense dans la p40H. La dégradation d'Edman de la p40, p40H et p40L a produit la même séquence des acides aminés du côté NH<sub>2</sub>-terminal. La cotinine a été mesurée dans le cerveau et le plasma de rat dit naïf et l'administration d'une solution saline isotonique a baissé ses concentrations cérébrales. Par opposition, l'administration de la nicotine (0,1 mg.kg<sup>-1</sup>) a augmenté les concentrations de cotinine 1 mg.kg<sup>-1</sup> et inhibé celles de la cotinine 10 et 70

## LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LE RENFORCEMENT DES STIMULATIONS STRESSANTES ET ANTI-STRESSANTES

mg.kg<sup>-1</sup>. La mecamylamine (1 mg.kg<sup>-1</sup>) n'a montré aucun effet alors que l'hexamethonium (1 mg.kg<sup>-1</sup>) a inhibé les concentrations cérébrales de la cotinine 70 mg.kg<sup>-1</sup>. Les concentrations plasmatiques de cotinine 70 mg.kg<sup>-1</sup> ont été inhibées par la nicotine et l'hexamethonium. L'administration de la solution saline a stimulé l'ancrage de la p40 à 60 min et la cotinine a réduit le temps de la réponse à 40 min. L'administration répétée de la solution saline a stimulé l'affinité de la cotinine et n'a pas affecté la liaison totale, alors que la nicotine a réduit la liaison totale aux sites de basse affinité. Les effets de la nicotine ont été inhibés par de fortes doses de cotinine, mais les mélanges ont restauré le site de basse affinité du traitement dit naïf. Le rendement de la chromatographie d'affinité en protéines totales a été stimulé par la solution saline, la nicotine et la cotinine, cependant le traitement par les mélanges était moins actif. Le rendement en protéines supérieures à 40-kDa a été stimulé par tous les traitements. Le rendement de la p40H a été inhibé par la cotinine (EC<sub>50</sub> < 1 mg.kg<sup>-1</sup>) mais le traitement par les mélanges a restauré la p40H du traitement dit naïf. Le rendement de la p40L a été inhibé par le traitement par les mélanges. Le rendement en protéines inférieures à 40-kDa n'a été affecté par aucun traitement. Le Western Blot a montré que les solutions saline, nicotine, cotinine et leurs mélanges ont stimulé, par un mécanisme additif, l'ancrage de la p40H dans les membranes cérébrales.

**Conclusion** Ces résultats représentent un support pharmacocinétique, pharmacodynamique et comportemental en faveur des rôles opposés de la cotinine dans l'augmentation, par un mécanisme additif, des stimulations stressantes et, par un mécanisme de potentialisation, des stimulations anti-stressantes.

**Mots Clés** Interaction de la nicotine et de la cotinine ; récepteurs de la nicotine et de la cotinine ; stress et anti-stress ; rongeurs.

# **LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LE RENFORCEMENT DES STIMULATIONS STRESSANTES ET ANTI-STRESSANTES**

## **INTRODUCTION**

Chez l'homme, la nicotine est rapidement métabolisée en cotinine (Bowman et al., 1959). La demi-vie et les concentrations de cotinine sont 10 fois supérieures à celles de la nicotine (Benowitz et al., 1983). Les concentrations de cotinine dans les échantillons biologiques sont utilisées pour distinguer les fumeurs actifs, pour des concentrations au-dessus de 500 ng/mL, des fumeurs passifs, pour des concentrations inférieures à 500 ng/mL. Cependant, les concentrations chez les patients ni fumeurs actifs ni fumeurs passifs ne sont pas nulles (Benowitz et al., 1983). La cotinine des patients non fumeurs non exposés à la fumée du tabac (Benowitz et al., 1983) sera rapportée, par la suite, cotinine endogène (EndoC) par opposition à la cotinine exogène (ExoC) qui provient du métabolisme de la nicotine. La nicotine peut provenir du tabagisme actif ou passif (Di Giusto and Eckhard, 1986) et de certains aliments (Siegmund et al., 2001) alors que la cotinine est considérée provenir exclusivement du métabolisme de la nicotine (Bowman et al., 1959; Benowitz et al., 1983) et n'a pas été détectée dans les aliments (Siegmund et al., 2001). Ces deux alcaloïdes ont été équipotents pour affecter distinctivement la fonction de la cellule endothéliale, la synthèse du monoxyde d'azote (NO) (Conklin et al., 2001) et les hormones de l'axe hypophyse surrénales (Andersson et al., 1993). La cotinine a été proposée agir au niveau de l'éminence médiane (Andersson et al., 1993) et a affecté les processus de traitement de l'information chez les non-fumeurs (Herzig et al., 1998). La forte expression de l'allèle normal de CYP2A6, l'enzyme responsable de la conversion de la nicotine en cotinine, a été associée de manière significative à la dépendance tabagique (Pianezza et al., 1998). La cotinine a été active (Keenan et al., 1994) ou inactive (Hatsukami et al., 1997) dans l'aide au sevrage tabagique.

La nicotine et les promesses de son utilisation dans les thérapeutiques reposent sur son pouvoir de pénétration dans le cerveau et d'augmentation des fonctions cholinergiques (Court et al., 1998). Aussi, le risque associé aux médicaments à base de nicotine est largement

## **LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LE RENFORCEMENT DES STIMULATIONS STRESSANTES ET ANTI-STRESSANTES**

inférieur à celui du tabagisme (Heishman et al., 1997). Les activités pharmacologiques de la nicotine seraient liées à son activation des récepteurs nicotinique à l'acétylcholine (nAChRs) neuronaux une famille très diversifiée de récepteurs dont le prototype est le récepteur nAChRs de la plaque motrice (Galzi and Changeux, 1995). Ces récepteurs sont modulables par l'administration (Sparks and Pauly, 1999) et le retrait (Pietila et al., 1998) de la nicotine. On a décrit plusieurs types de modulations comme la désensibilisation (perte d'activité), la sensibilisation (suractivité), l'augmentation dans le cerveau et la baisse dans la périphérie de la densité des récepteurs (Marks et al., 1983; Ochoa, 1994). L'up régulation des nAChRs centraux est associée à l'apparition de la fraction désensibilisée (Marks et al., 1983; Ochoa, 1994). Cependant, la désensibilisation est jugée insuffisante pour expliquer l'up régulation des récepteurs (Rowell and Li, 1997). Elle serait liée à l'effet inhibiteur de la nicotine sur le rythme de renouvellement (turn-over) des récepteurs (Peng et al., 1994). Enfin, l'up régulation des nAChRs centraux ne s'accompagne pas de synthèse *de novo* messagers ou de protéines des sous-unités du nAChRs (Marks et al., 1983; Ochoa, 1994; Peng et al., 1994). Elle serait un phénomène unique aux nAChRs, car pour la majorité des récepteurs centraux la surexposition à l'agoniste produit une down régulation et la surexposition à l'antagoniste une up régulation (Creese and Sibley, 1981). Dans ce cas, la nicotine serait un antagoniste des nAChRs ou que son métabolisme produit l'antagoniste, et la cotinine a été proposée pour ce rôle *in vivo* (Marks et al., 1983). Des expériences par microdialyse chez le rat ont montré qu'un pré traitement par la cotinine inhibe la libération de la dopamine du noyau accumbens normalement induite par la nicotine et la cocaïne, suggérant que la cotinine agirait sur un composant du système de la récompense (Sziraki et al., 1999). De plus, la cotinine comme la nicotine a atténué l'incordination motrice de l'éthanol (Dar et al., 1993; Dar et al., 1994). Enfin, la nicotine a stimulé la production de NO cérébral chez le rat (Pogun et al., 2000) en mobilisant le NO des cellules non-neuronales (Weruaga et al., 2002). Ainsi la compréhension

## **LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LE RENFORCEMENT DES STIMULATIONS STRESSANTES ET ANTI-STRESSANTES**

des effets de la nicotine et son utilisation dans les thérapies (Whitehouse et al., 1988; Balfour and Fagerstrom, 1996; Benowitz, 1996, 1999) reposent sur la connaissance des mécanismes de fonctionnement et de régulation de ses récepteurs et les actions et interactions avec ses dérivés. Les travaux ont montré que pour la majorité des dérivés testés, à l'exception de certaines activités de la cotinine, les effets pharmacologiques sont comparables à ceux de la nicotine (Kim et al., 1968; Risner et al., 1985; Chahine et al., 1990; Andersson et al., 1993; Vainio et al., 1998; Sziraki et al., 1999; Vainio et al., 2000). Plus intéressant, nous avons montré les interactions synergiques entre la nicotine et la cotinine (Riah et al., 1997; Riah et al., 1999), comparé leur transport dans le cerveau (Riah et al., 1998) et isolé le récepteur de la cotinine (Riah et al., 2000). Nos résultats montrent une potentialisation des effets toxiques de la cotinine par l'hexamethonium (Riah et al., 1999), une majoration de la prise de poids par la cotinine (Riah et al., 1999) et un profil pharmacologique et des récepteurs différents pour la nicotine et la cotinine (Riah et al., 2000). L'analyse de la séquence des acides aminés de la protéine purifiée ou p40 n'a pas montré d'identité avec les protéines connues mais, une homologie significative avec des protéines humaines, comme la protéine p205 isolées du liquide synovial (Hain et al., 1996) et la p38 isolée des fibroblastes (Bush et al., 1998) et des calculs rénaux (Binette and Binette, 1994). Celles-ci ont été impliquées dans les réactions immunitaires (Hain et al., 1996), inflammatoires (Binette and Binette, 1994; Hain et al., 1996) et la croissance cellulaire (Bush et al., 1998), suggérant un lien avec le NO. Ce même NO a été impliqué dans la récompense de la nicotine chez l'animal (Martin and Itzhak, 2000) et cette récompense serait responsable de l'initiation et du maintien de la dépendance tabagique. Étant donné que la récompense de la nicotine ne s'acquière qu'après son administration répétée (Clarke and Fibiger, 1987; Shoab et al., 1994) dans un contexte où il y'a le stress de la manutention des animaux (Schmitt and Hiemke, 1998) et de l'administration saline isotonique (Lukic and Haldar, 1993; Weruaga et al., 2002), nous avons étudié la modulation



## **LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LE RENFORCEMENT DES STIMULATIONS STRESSANTES ET ANTI-STRESSANTES**

de la biodisponibilité de la cotinine et de ses récepteurs par le stress de l'administration saline isotonique (Lukic and Haldar, 1993) et la nicotine car, la simple détection de la cotinine endogène est insuffisante. Les résultats obtenus permettent de proposer le mécanisme des effets opposés de la cotinine dans le renforcement additif du stress et dans le renforcement synergique (potentialisation) de l'effet anti-stress de la nicotine.

### **MATÉRIELS ET MÉTHODES**

Les rats Sprague-Dawley mâles (IFFA Credo ; France), les souris *Mus musculus* et les lapins New Zélandais (Depré ; France) étaient naïfs à tout traitement et ont été gardés au moins 3 jours avant toute expérimentation. Les animaux ont été hébergés dans des cages en inox par 1 (lapins), 3 (rats) et 10 (souris) au rythme jour nuit (lumière de 7h à 18h) à la température de  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Les animaux avaient un accès *ad libitum* à la nourriture et à l'eau. Les protocoles expérimentaux étaient en accord avec les directives de l'Institut National de la Santé Guide de l'Utilisation et de la Protection des Animaux de Laboratoire et ont été approuvés par le Comité National Protection et Utilisation des Animaux de l'Université Paul Sabatier. Tous les principes actifs sont de chez Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO), exception pour la cotinine (Riah et al., 1998) et le gel d'affinité (Riah et al., 2000) que nous avons synthétisés, les anticorps anti p40 que nous avons produits, les membranes de nitrocellulose pure (PROLABO) et le Kit de révélation Opti-4CN (BIO-RAD).

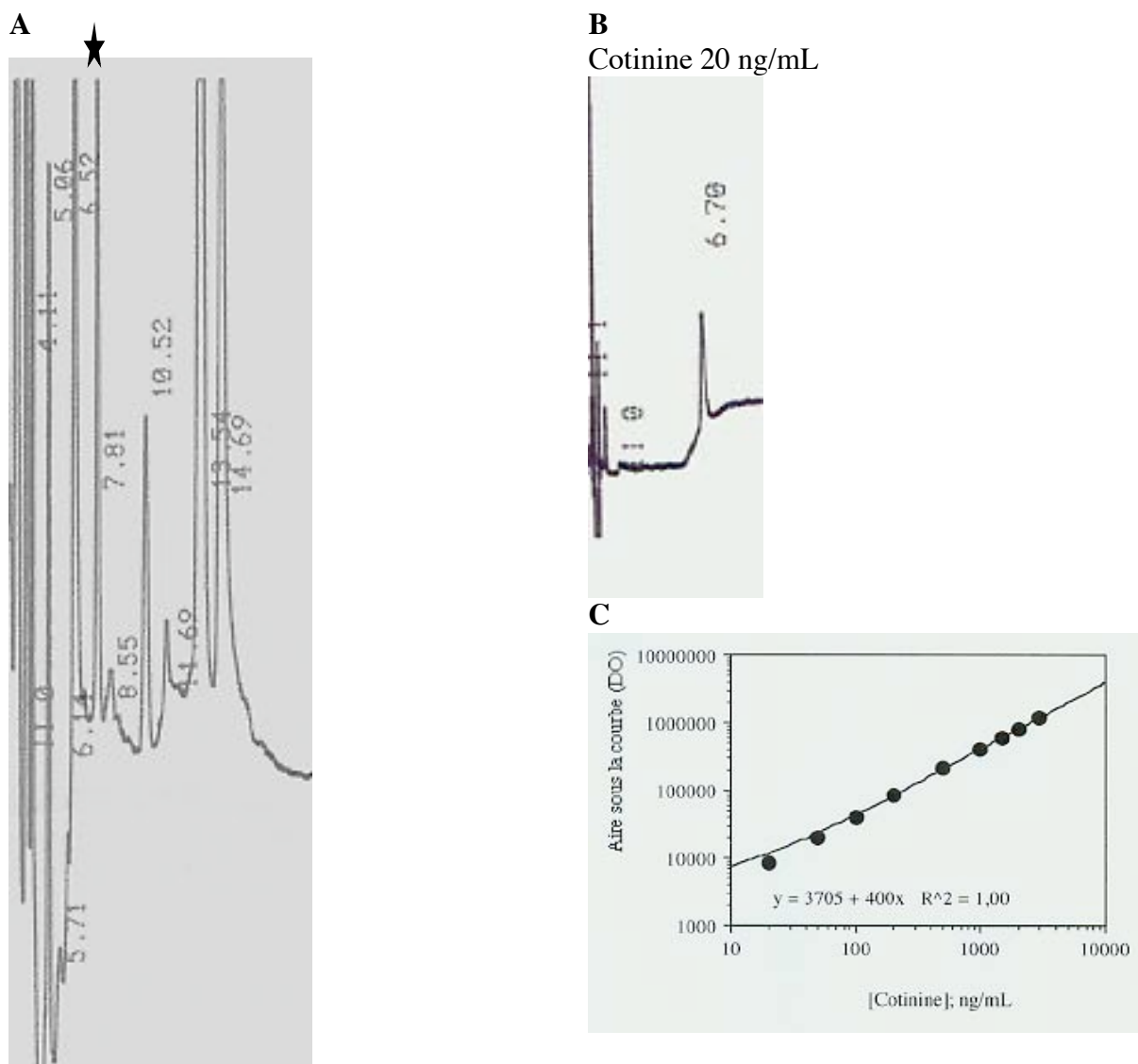
La cotinine a été extraite par le méthanol comme les alcaloïdes (Reavill et al., 1990) et quantifiées par HPLC (Hariharan et al., 1988), RIA (RIA, Nicotine metabolite double-antibody kit, Behring-DPC) et CCM (Riah et al., 1998). L'adaptation des récepteurs de la cotinine a été étudiée par la fixation du radioligand [ $^{125}\text{I}$ ]-cotinine dans différentes régions cérébrales et par une légère modification des conditions de chromatographie d'affinité (Riah et al., 2000). La modification a consisté à baisser la concentration des protéines avant de

## **LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LE RENFORCEMENT DES STIMULATIONS STRESSANTES ET ANTI-STRESSANTES**

charger la colonne d'affinité pour lier les récepteurs de plus faible affinité. Les rats ont été sacrifiés, les cerveau prélevés par décapitation, rincé dans 0,9 % NaCl froid et stockés à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Les membranes ont été extraites dans le tampon Tris-HCl, incubées 2 heures dans l'eau pour laver les ligands (Bylund, 1992), solubilisées dans le CHAPS-10 mM, dialysées extensivement, lyophilisées et reprises dans le tampon Tris-HCl-CHAPS-1 mM (0,1 g tissu/mL) avant de charger les colonnes d'affinité (1 g tissu/ colonne). Lorsqu'un dosage de protéine est prévu, les membranes sont reprises dans le tampon Tris-HCl, les protéines quantifiées et mises en suspension dans le tampon de charge de gel (MAT & METH). Pour les Westen Blots, les protéines ont été chargées (1  $\mu\text{g}$  protéine ou tissu par piste), sur gel SDS-PAGE 12 %, transférées sur membrane de nitrocellulose pure. Cette dernière est lavée, bloquée puis incubée une nuit à  $4^{\circ}\text{C}$  avec le sérum immun. Elle est ensuite lavée et révélée avec les anticorps secondaires et les substrats du Kit Opti4-CN de BIO-RAD comme décrit par le fournisseur. Nous avons produit, chez la souris *Mus musculus*, un sérum immun dirigé contre les récepteurs de la cotinine par une primo vaccination intramusculaire (20  $\mu\text{g}$  protéine) dans l'adjuvant complet de Freud, puis plusieurs vaccinations (5  $\mu\text{g}$  protéine) dans l'adjuvant incomplet de Freud. Le sang a été prélevé au niveau de la veine caudale entre 5-7<sup>ème</sup> jour après chaque vaccination, le sérum préparé et stocké à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Le titre et la spécificité ont été mise au point pour étudier, par Western Blot, la modulation des récepteurs p40 de la cotinine. Les p40s ont été purifiées et identifiées par digestion à la trypsine suivie d'une HPLC et par le séquençage NH2 terminal (Riah et al., 2000).

Analyse des données : les données de la liaison du radioligand ont été modelées à un ou deux sites dans un programme pour les régressions non-linéaires (Leatherbarrow, 1987). Les gels SDS-PAGES ont été colorés au nitrate d'argent, quantifiées par densimétrie et le bruit de fond soustrait pour obtenir la densité optique de l'aire sous la courbe (AUC). Les pistes ont ensuite été subdivisé en 4 zones : p40H, p40L, zone supérieure à p40H (ZP40H) et zone

## LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LE RENFORCEMENT DES STIMULATIONS STRESSANTES ET ANTI-STRESSANTES



**Figure 20.** Analyse et sensibilité du dosage par chromatographie liquide haute pression (HPLC) de la cotinine endogène. Les rats ont été traités par la solution saline isotonique et la cotinine a été extraite et quantifiée comme décrit dans la légende du Tableau VIII. En A, le pic cotinine d'un rat traité par la solution saline isotonique et sacrifié au temps 0-5 min ; le temps de rétention de la cotinine endogène est  $6,51 \pm 0,02$  ( $n = 9$ ). En B, le pic de la cotinine 20 ng/mL, synthétisée au Laboratoire (Riah et al., 1997; Riah et al., 1998), est visible avec une AUC voisine de 8500 DO et un temps de rétention  $6,59 \pm 0,24$  ( $n=19$ ). En C, la courbe d'étalonnage de la cotinine pour le dosage par HPLC montre que le seuil de détection dépasse 10 ng/mL.

# **LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LE RENFORCEMENT DES STIMULATIONS STRESSANTES ET ANTI-STRESSANTES**

inférieure à p40L (ZP40L) et les zones exprimées en % de l'AUC. La normalité (Davis) et l'homogénéité des variances (Cochran) des données ont été vérifiées avant une analyse de variance (ANOVA) appropriée. Les moyennes ont été comparées au seuil de Scheffé. Une probabilité  $P \leq 0,05$  a été considérée significative.

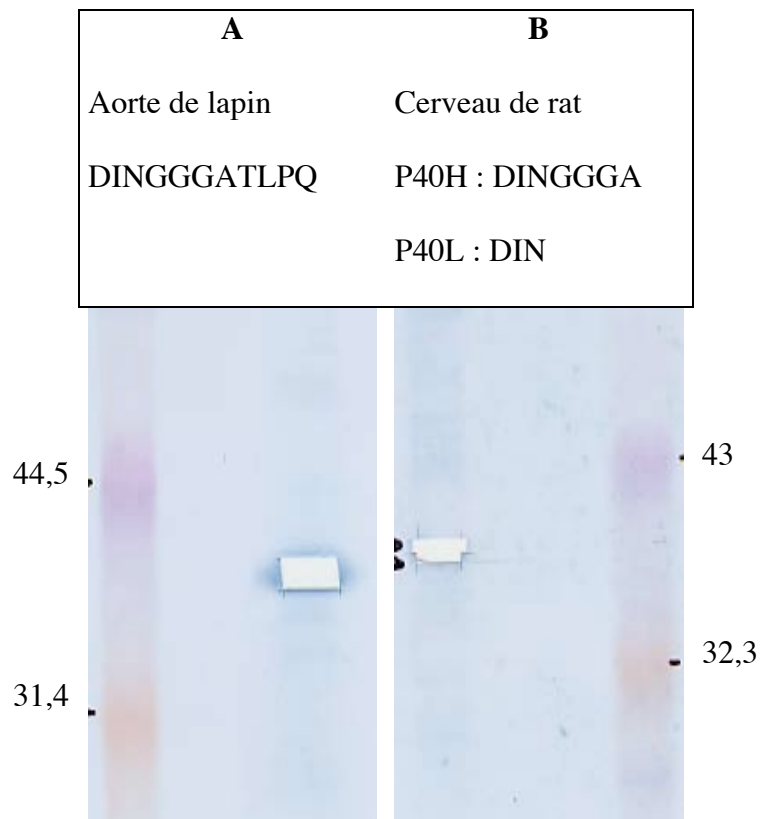
## **RÉSULTATS**

### **I- Effets des traitements aigus sur la biodisponibilité de la cotinine.**

**1-1- Modulation de la biodisponibilité de EndoC.** Nous avons étudié l'effet de l'administration de la solution saline isotonique sur la biodisponibilité de la cotinine endogène (EndoC) dans les mêmes conditions expérimentales que la cotinine exogène (ExoC) (Tableau VIII). Le dosage dans le tissu cérébral a été réalisé par HPLC sans réplication et par RIA avec réplication. Le dosage dans le plasma a été réalisé par RIA avec réplication.

Dans le cerveau, les résultats par HPLC montrent que le temps de rétention de EndoC  $R_t=6,51\pm 0,02$ ,  $n=9$  (Fig. 20 A) est comparable à celui de la cotinine  $R_t=6,69\pm 0,15$ ,  $n=36$  (Fig. 20 B). Dans nos conditions HPLC, la sensibilité du dosage de la cotinine dépasse 10 ng/mL (Fig. 20 C). Les deux cotinine ont donc des propriétés physico-chimiques comparables par HPLC et une réactivité immunologique identique par RIA (Tableau VIII). En utilisant la réplication par RIA, une analyse de variance à deux voies (bloc : Individu x Temps) montre des effets significatifs liés aux individus ( $F_{2,9} = 4,5$ ;  $P \leq 4,5 \cdot 10^{-2}$ ) et aux interactions ( $F_{4,9} = 7$ ;  $P \leq 7 \cdot 10^{-3}$ ). Une analyse de variance une voie montre que les individus sont significativement différents ( $F_{2,3} = 13$ ;  $P \leq 3,4 \cdot 10^{-2}$ ) à 0-5 min et ne sont pas significativement différents à 20 ( $F_{2,3} = 1$ ;  $P$  NS (non significatif)) et à 60 min ( $F_{2,3} = 0,2$ ;  $P$  NS). En prenant la moyenne des valeurs par RIA, une analyse de variance deux voies avec réplication (bloc : Technique x Temps) montre que l'administration de la solution saline isotonique affecte, significativement ( $F_{5,12} = 4$ ;  $P \leq 2 \cdot 10^{-2}$ ), les concentrations cérébrales de EndoC (Tableau

## LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LE RENFORCEMENT DES STIMULATIONS STRESSANTES ET ANTI-STRESSANTES



**Figure 21.** Présence dans le cerveau et absence dans l'aorte du doublet p40 chez le rongeur naïf. La p40 a été purifiée à partir de l'aorte de lapin et du cerveau de rat par chromatographie d'affinité (Riah et al., 2000) dans les mêmes conditions expérimentales. Les protéines purifiées ont été séparées par 12 % (aorte) et 10 % (cerveau) SDS-PAGE, transférées sur membranes PVD (ProBlot), rapidement colorées à l'amidoblack, la p40 de l'aorte et la p40H et la p40L cérébrales ont été découpées et soumise à la dégradation d'Edman. En A et B, la séquence des acides aminés côté NH2 terminal de la p40 de l'aorte, et de la p40H et la p40L cérébrales est identique.

## LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LE RENFORCEMENT DES STIMULATIONS STRESSANTES ET ANTI-STRESSANTES

VIII). L'effet lié aux techniques (HPLC/ RIA) ( $F_{1,12} = 0,26$  ;  $P$  NS) n'est pas significatif et l'effet lié aux temps ( $F_{2,12} = 14$  ;  $P \leq 6.10^{-4}$ ) est significatif. Les interactions TechniquesxTemps ( $F_{2,12} = 1,6$  ;  $P$  NS) ne sont pas significatives. L'administration de la solution saline baisse, significativement, la concentration de EndoC à 20 min ( $t=4,8$  ;  $P \leq 0,05$ ) et 60 min ( $t=4,47$  ;  $P \leq 0,05$ ) par rapport au temps 0-5 min (Tableau VIII). Pour tester la régression linéaire, nous avons combiné les valeurs par RIA et par HPLC en utilisant la moyenne des valeurs par RIA des individus à 0-5 min. Pour les autres temps, nous avons utilisé les répliques. Les déviations de la régression ( $F_{1,21} = 24$  ;  $P \leq 8.10^{-5}$ ) sont significatives. Les valeurs ont été modelées, significativement ( $P \leq 0,05$ ), par une polynomiale de second ordre d'équation  $[EndoC]=1339-63x(\text{temps})+0,8x(\text{temps})^2$ .

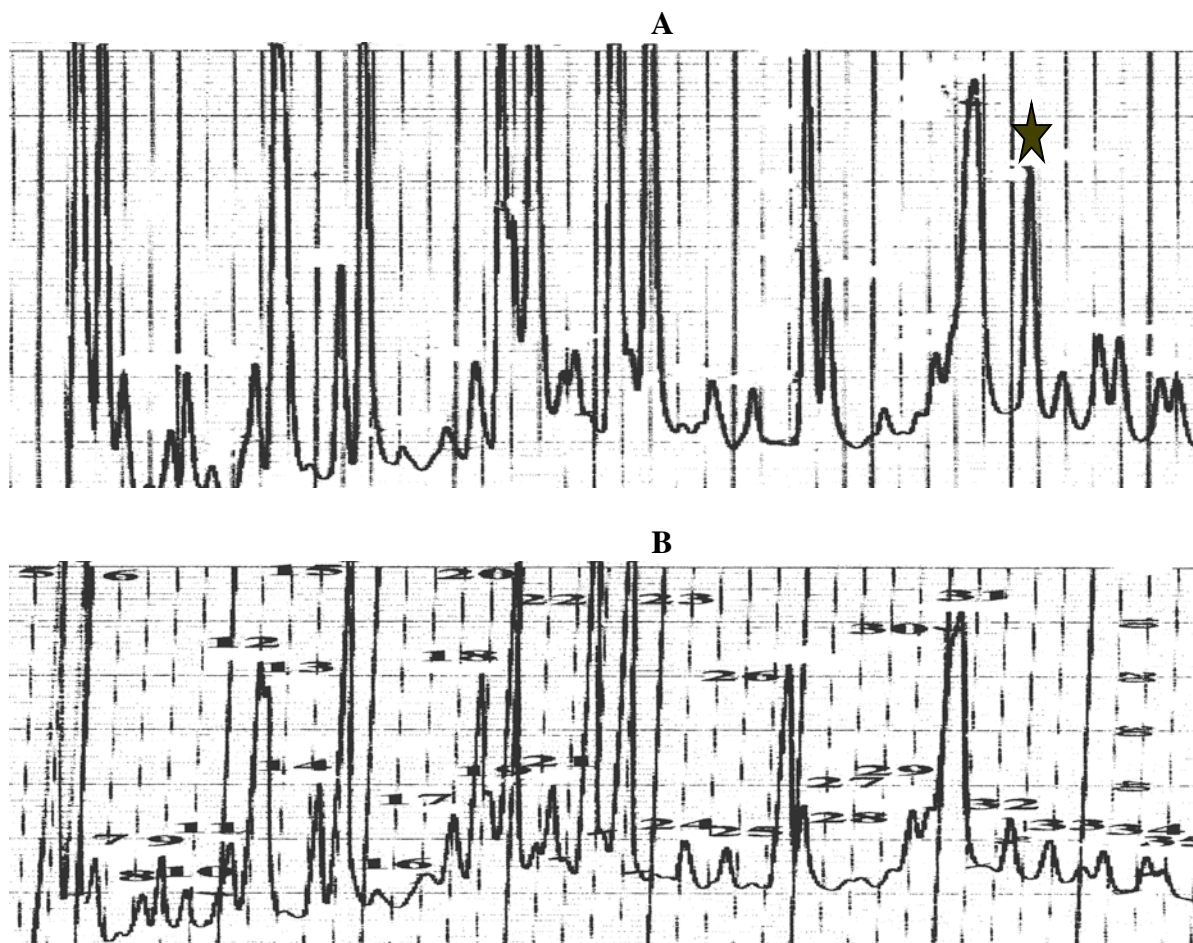
**Tableau VIII.** Effet du stress de l'administration saline isotonique sur la biodisponibilité de la cotinine : comparaison avec l'administration de cotinine.

Traitement ; min	Cerveau	Plasma	Rapport
Saline ; 0-5	1200±140/980±150	495 ± 93	2,4
Saline ; 20	412±40/397±39*	561 ± 70	0,9*
Saline ; 60	370±43/527±190*	4376 ± 1985	0,1*
Cotinine 70 ; 0-5	6325±456/13002±418	51340 ± 23462	0,1
Cotinine 70 ; 20	10183±1360/19306±2106*	42455 ± 6102	0,3*
Cotinine 70 ; 60	7987±784/8640±358	41837 ± 2307	0,2

\*,  $P \leq 0,05$  par rapport au temps 0-5 min (Scheffé). Valeurs HPLC à droite et RIA à gauche.

30 rats ont reçu la solution saline isotonique seule ou avec la cotinine (1, 10 et 70) et sacrifié au temps 0-5, 20 et 60 min. 3 individus ont été prélevés au hasard pour l'extraction de la cotinine par le méthanol comme pour les alcaloïdes (Reavill et al., 1990) et sa quantification par HPLC (Hariharan et al., 1988) et RIA (Riah et al., 1998).

## LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LE RENFORCEMENT DES STIMULATIONS STRESSANTES ET ANTI-STRESSANTES



**Figure 22.** Identité des profils par HPLC des produits de la digestion, par la trypsine, de la p40H et de la p40L cérébrales. La p40H et la p40L ont été préparées comme décrit dans la légende de la Fig. 21 et digérées par la trypsine. Les peptides de la digestion ont été séparés par HPLC sur une colonne en ligne de DEAE-C18 (1 mm de diamètre) avec un gradient d'acétonitrile / TFA 0,1%. Le pic marqué étoile dans la p40H, absent dans la p40L, a été soumis à une dégradation d'Edman. La séquence des acides aminés côté NH<sub>2</sub> terminal obtenue GNPDVWVPVFGATTGGGVVAYPD est absente des banques de données.

## LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LE RENFORCEMENT DES STIMULATIONS STRESSANTES ET ANTI-STRESSANTES

Dans le plasma, les variations interindividuelles sont significatives à 0-5 min ( $F_{1,2} = 23$  ;  $P \leq 1,2.10^{-2}$ ), 20 min ( $F_{2,3} = 15$  ;  $P \leq 2,7.10^{-2}$ ) et 60 min ( $F_{2,3} = 45$  ;  $P \leq 5,8.10^{-3}$ ). En utilisant les moyennes par RIA l'analyse de variance ne montre aucun effet significatif ( $F_{2,6} = 1,57$  ;  $P NS$ ) du temps sur les concentrations de EndoC plasmatique (Tableau VIII).

**1-2- Modulation de la biodisponibilité de ExoC par les ligands nicotiques.** Nous avons étudié l'effet de l'administration des ligands nicotiques sur la biodisponibilité de la cotinine exogène (ExoC) dans les mêmes conditions expérimentales que la cotinine endogène (EndoC) (Tableau IX).

**Tableau IX.** Effet de la nicotine et ses antagonistes sur la biodisponibilité de la cotinine.

Traitement 60 min	Cerveau	Plasma	Rapport
Cotinine 1	484±47/253±19	-	-
Cotinine 10	2612±451/2658±321	-	-
Cotinine 1 + nicotine	3948±379/5136±826*	-	-
Cotinine 10 + nicotine	1050±96/834±214	-	-
Cotinine 70 + nicotine	3403±420/7396±584**	18510±4448*	0,2
Cotinine 70 + Hexam	532±82/508±42**	27783±1856*	0,02**
Cotinine 70 + Mecam	4367±669/11809±1743	31145±1346	0,1

-, n'a pas été fait ; \* et \*\*,  $P \leq 0,05$  et  $0,01$  par rapport au contrôle respectif (Scheffé).

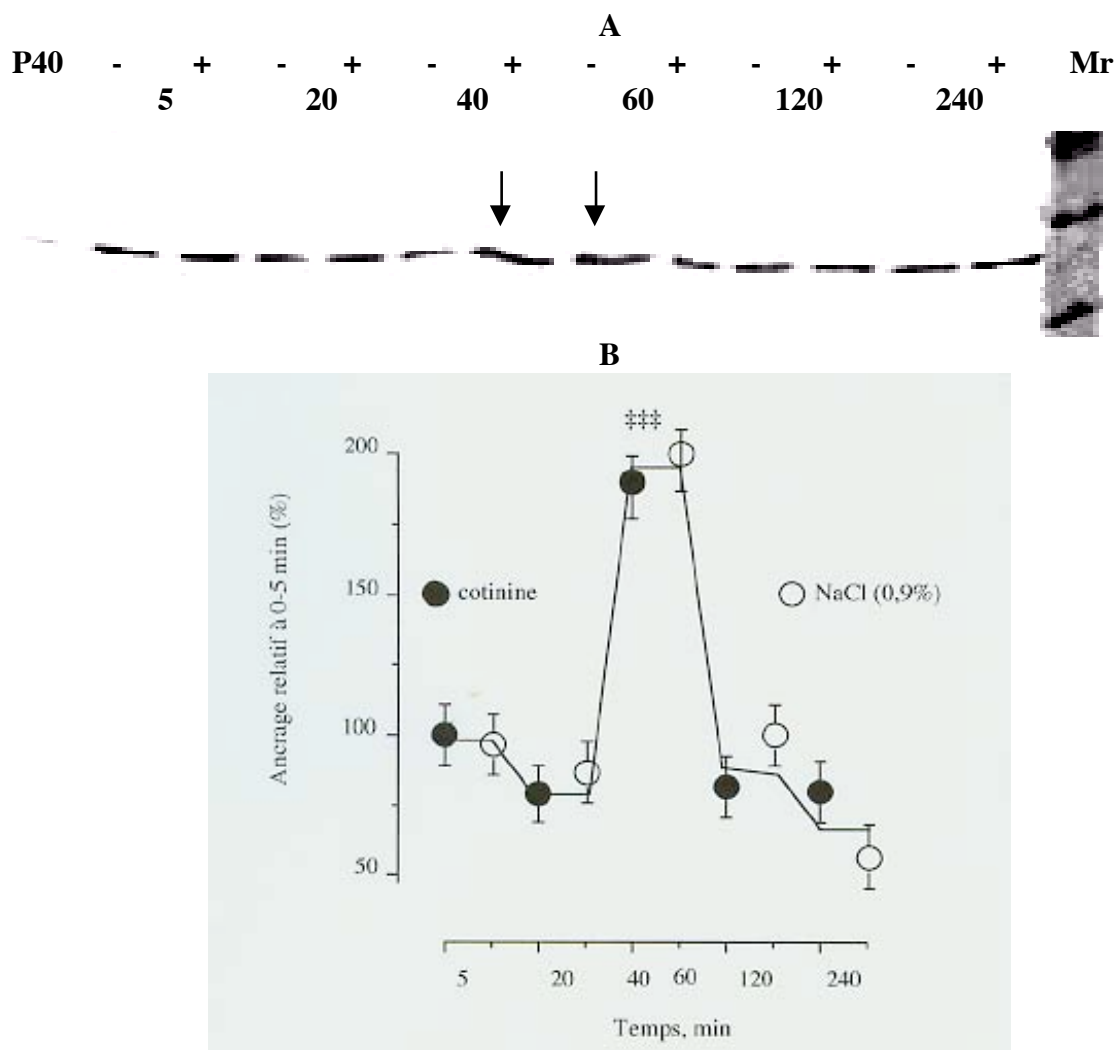
15 rats ont reçu les doses de cotinine (1 ; 10 et 70) en mélange avec la nicotine (0,1 mg.kg<sup>-1</sup>).

10 rats ont reçu la cotinine 70 mg.kg<sup>-1</sup> en mélange avec 1 mg.kg<sup>-1</sup> hexamethonium (Hexam) ou mecamlamine (Mecam). Ces rats ont été sacrifiés au temps 60 min pour l'extraction et la quantification de la cotinine, comme décrit dans la légende du Tableau VIII.

Dans le cerveau, en utilisant la moyenne des réplifications par RIA et les valeurs par HPLC, une analyse de variance à deux voies (bloc : DosexNicotine) montre des effets significatifs



## LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LE RENFORCEMENT DES STIMULATIONS STRESSANTES ET ANTI-STRESSANTES



**Figure 23.** La cotinine précipite l'effet stimulant du stress de l'administration saline isotonique sur l'ancrage de la p40 dans les membranes cérébrales. 12 rats ont reçu la solution saline isotonique (0,9 % NaCl ; 1 ml.kg<sup>-1</sup>) seule ou avec la cotinine (10 mg.kg<sup>-1</sup>) et ont été sacrifiés entre 0-5 et 240 min pour extraire les protéines membranaires du cerveau par le CHAPS et les doser avant de les remettre en suspension dans le tampon de dépôt et étudier, par Western Blot, l'ancrage de la p40H dans les membranes du cerveau. En A les protéines (1 µg par piste) ont été séparées par 12 % SDS-PAGE, transférées sur membrane de nitrocellulose et incubées avec le sérum dirigé contre la p40 à la dilution 1/5000. Les membranes de nitrocellulose ont été révélées avec le Kit Opti-4CN (BIO-RAD). P40, contrôle positif ; Mr, marqueurs de taille relative (66, 45 et 39 kDa) ; flèche, localise l'augmentation de l'ancrage de la p40 à 40 min par la cotinine, et à 60 min par la solution saline isotonique. En B, les bandes ont été quantifiées par densimétrie et l'aire sous la courbe (AUC) de la p40 a été analysée par ANOVA deux voies sans réplication (Bloc Temps x Traitement). Bar, erreur

## **LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LE RENFORCEMENT DES STIMULATIONS STRESSANTES ET ANTI-STRESSANTES**

standard (SD) ; \*\*\*,  $P \leq 0,01$  entre 40 min pour la cotinine, et 60 min pour la solution saline isotonique versus le temps 0-5 min.

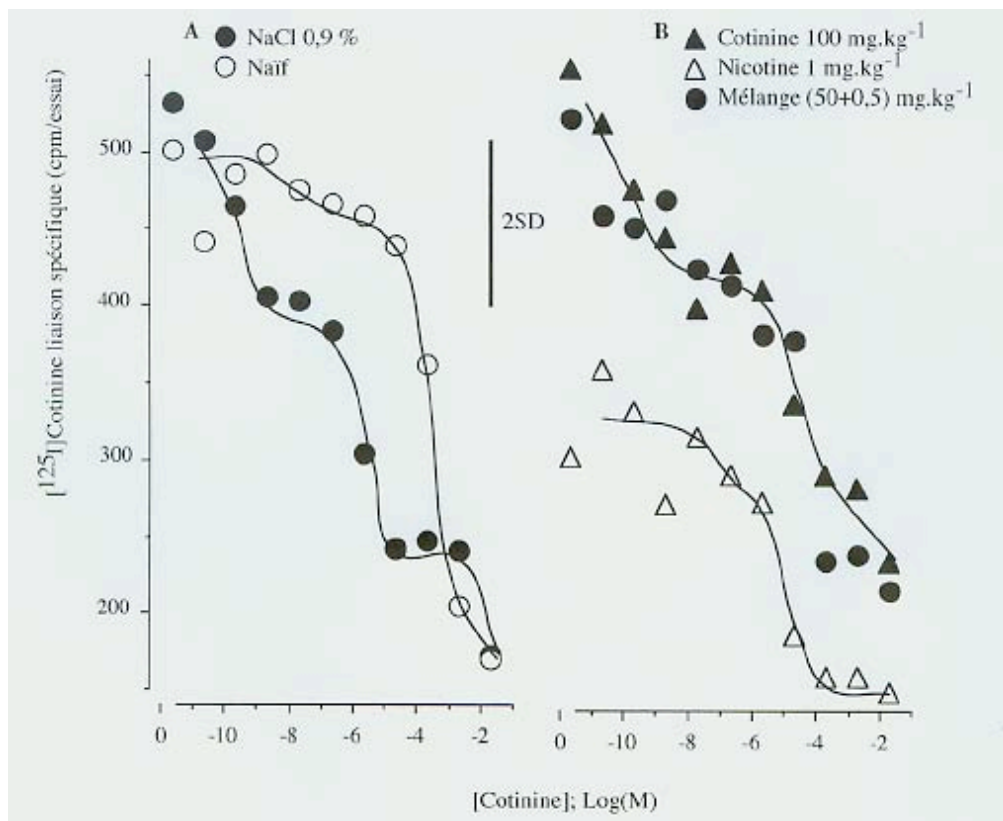
liés à la dose ( $F_{2,30} = 36$  ;  $P \leq 10^{-8}$ ), à la nicotine ( $F_{1,30} = 7$  ;  $P \leq 2.10^{-2}$ ) et aux interactions DosexNicotine ( $F_{2,30} = 19$  ;  $P \leq 4.10^{-6}$ ). La nicotine stimule ( $t=2,71$  ;  $P \leq 0,05$ ) les concentrations cérébrales de ExoC 1 et inhibe ( $t=6,06$  ;  $P$  HS (hautement significatif)) les concentrations cérébrales de ExoC 70 (Tableau IX). Cet effet de la nicotine atténue l'effet des doses de cotinine sur ses concentrations cérébrales (entre 10 et 70  $t=4,53$  ;  $P$  HS sans nicotine et  $t=1,67$  ;  $P$  NS avec nicotine). Par opposition, l'administration de la cotinine 70 avec  $1 \text{ mg.kg}^{-1}$  hexamethonium, un antagoniste cholinergique périphérique, produit l'effet opposé (Tableau IX). En utilisant la moyenne des réplifications par RIA et les valeurs par HPLC, l'analyse de variance une voie montre un effet significatif ( $F_{3,20} = 10$  ;  $P \leq 3.10^{-4}$ ) du traitement sur les concentrations cérébrales de ExoC. L'hexamethonium inhibe significativement ( $t=5,35$  ;  $P$  HS) les concentrations cérébrales de ExoC (Tableau IX). À l'inverse, la mecamlamine à cette dose n'a pas d'effet significatif ( $t=2,27$  ;  $P$  NS) (Tableau IX). L'inhibition par l'hexamethonium est si forte que la concentration cérébrale égalise celle des rats traités par la solution saline ( $t=0,05$  ;  $P$  NS entre EndoC et ExoC cérébrales) alors que la concentration plasmatique est plus forte ( $t=5,46$  ;  $P$  HS entre ExoC et EndoC plasmatiques) (Tableau VIII ; IX).

Dans le plasma, une analyse de variance montre un effet significatif ( $F_{3,20}=12$  ;  $P \leq 9.10^{-5}$ ) du traitement sur les concentrations de ExoC 70 plasmatiques. La nicotine inhibe plus fortement ( $t=5,99$  ;  $P$  HS) que l'hexamethonium ( $t=3,61$  ;  $P \leq 0,05$ ) que la mecamlamine ( $t=2,74$  ;  $P$  NS) les concentrations plasmatiques de cotinine (Tableau IX).

**II- Identification des récepteurs centraux et périphériques de la cotinine.** Le protocole de fixation de la [ $^{125}$ I]-cotinine n'a pas été modifié, car il avait déjà montré la multiplicité des

## LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LE RENFORCEMENT DES STIMULATIONS STRESSANTES ET ANTI-STRESSANTES

sites de la cotinine (Riah et al., 2000). Nous avons isolé par chromatographie d'affinité la protéine de l'aorte et les protéines du cerveau liant la cotinine. L'analyse SDS-PAGE montre



**Figure 24.** Opposition des effets de l'administration répétée de la solution saline isotonique seule ou avec la nicotine sur les sites récepteurs de la cotinine du cortex et réversion des effets de la nicotine par la cotinine. Les rats n'ont rien reçu (Naïf) ou ont reçu 11 injections IP sur une 7 jours d'une solution saline isotonique seule 1 ml.kg<sup>-1</sup> (NaCl 0,9 %) ou avec la nicotine (1 mg.kg<sup>-1</sup>), la cotinine (100 mg.kg<sup>-1</sup>) ou le mélange 0,5+50 mg.kg<sup>-1</sup>. Ils ont été sacrifiés, par élévation cervicale 48 heures après l'arrêt du traitement, les cerveaux prélevés, les membranes extraites (Bylund, 1992), incubées 8-12 heures (100 μg protéine par 100 μL) avec le radioligand 70 pM seul (liaison totale) ou en présence de concentrations croissantes de cotinine froide (inhibition). L'incubation a été terminée par filtration (filtre GF/B) et 3 lavages de 5 mL par le tampon refroidi à 4°C ((Riah et al., 2000). La radioactivité sur les filtres a été

## **LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LE RENFORCEMENT DES STIMULATIONS STRESSANTES ET ANTI-STRESSANTES**

comptée et analysée dans ENZFITTER (Leatherbarrow, 1987) et résumée dans le Tableau X. Les valeurs sont la moyenne de la différence entre la liaison totale et la liaison non spécifique, avec 10 mM cotinine, dans les membranes du cortex (n=3). Bar = 2 SD (déviation standard). que nous avons purifié la p40 de l'aorte (Fig. 21 A) et la p40H (haute) et la p40L (basse) du cerveau (Fig. 21 B).

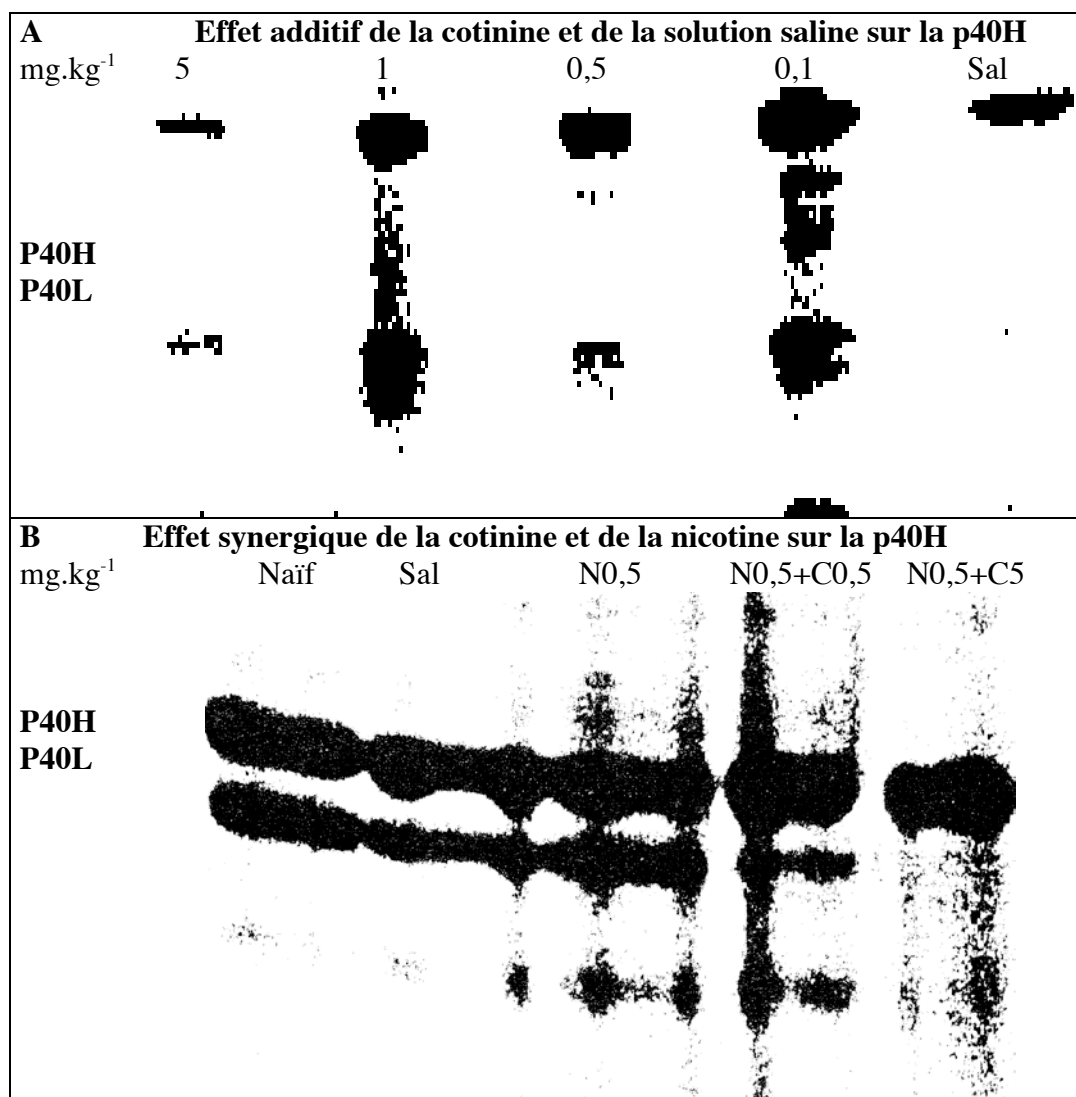
La dégradation d'Edman des p40s a montré pour p40 de l'aorte (Fig. 21 A) une séquence des acides aminés côté NH<sub>2</sub> terminal DINGGGATLPQ identique à celle des p40s du cerveau (Fig. 21 B). De plus, les anticorps anti-p40 du cerveau de rat ont permis d'identifier la p40, par Western Blot, dans différents tissus périphériques d'espèces différentes : lapin, souris, rat et homme (Chapitre V-C). Après digestion par la trypsine de la p40H (Fig. 22 A) et de la p40L (Fig. 22 B), l'analyse HPLC montre, à l'exception du pic marqué par une étoile plus intense dans la p40H (Fig. 22 A) que dans la p40L (Fig. 22 B), tous les autres pics, donc des profils identiques (Fig. 22). Ces résultats montrent que les récepteurs de la cotinine sont multiples, ubiquitaires et que les p40's du cerveau et de la périphérie ont une masse relative d'environ 40 kDa et la même séquence des acides aminés du côté NH<sub>2</sub> terminal (Fig. 21-22).

### **III- Effets à plus ou moins court terme sur les récepteurs de la cotinine.**

**3-1- Modulation à court terme de l'ancrage de la p40.** Pour étudier l'ancrage de la p40, nous l'avons comparé l'effet cinétique entre 0 et 240 min du traitement par la solution saline isotonique seule et avec la cotinine 10 mg.kg<sup>-1</sup>. Les rats ont été traités et sacrifiés pour étudier, par Western Blot, l'ancrage de la p40 dans les membranes du cerveau (Fig. 23 A). Une analyse de variance à deux voies sans réplication (Bloc : TraitementxTemps) de l'aire sous la courbe (AUC) de la p40 ne montre aucun effet ( $F_{1,4}=0,066$  ;  $P$  NS) lié au traitement mais un effet significatif ( $F_{4,4}=39$  ;  $P \leq 2.10^{-3}$ ) lié au temps. L'administration de la solution saline seule ou avec la cotinine stimule l'ancrage de la p40, respectivement, au temps 60 min ( $t=8,75$  ;  $P \leq$

## LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LE RENFORCEMENT DES STIMULATIONS STRESSANTES ET ANTI-STRESSANTES

0,05) et 40 min ( $t=7,89$  ;  $P \leq 0,05$ ) (Fig. 23 B). Ainsi, la cotinine précipite de 60 à 40 min la stimulation, par la solution saline isotonique, de l'ancrage de la p40 dans les membranes (Fig. 23).



**Figure 25.** La cotinine renforce, par un mécanisme additif, l'effet du stress de la solution saline isotonique et, par un mécanisme synergique (potentialisation), de l'effet anti-stress de la nicotine sur la p40H. Les rats ont été traités, sacrifiés et les cerveaux prélevés. Les p40s ont été purifiées comme décrit dans la légende de la Figure 21. Les protéines ont été séparées par 12 % SDS-PAGE, colorés au nitrate d'argent et les bandes analysées comme décrit dans la légende du Tableau XI. En A, les effets additifs de la cotinine et de la solution saline isotonique sur la p40H sont visualisés (Tableau XI ; Cotinine seule). En B, les effets

## **LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LE RENFORCEMENT DES STIMULATIONS STRESSANTES ET ANTI-STRESSANTES**

synergiques (potentialisation) de la cotinine et de la nicotine sur la p40H sont visualisés (Tableau XI ; Mélange). Les pistes représentent l'équivalent de 150 mg tissu de cerveau de rats traités comme indiquées par 11 IP sur 7 jours.

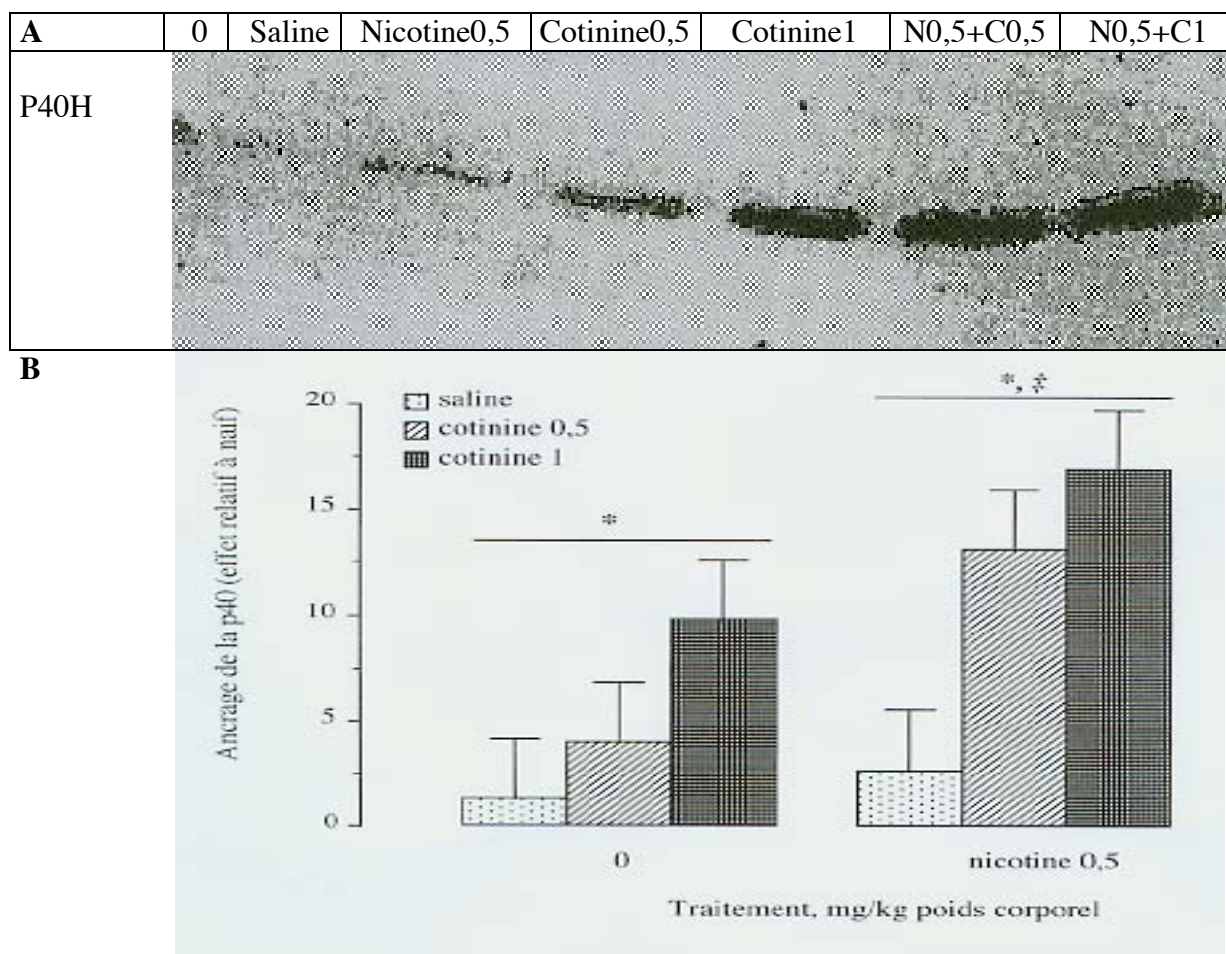
**3-2- Modulation à long terme des sites de la [<sup>125</sup>I]-cotinine.** Nous avons modélisé, dans un programme (Leatherbarrow, 1987) d'analyse des régressions non-linéaires, l'effet de l'administration IP, 11 fois sur 7 jours, de la solution saline isotonique seule, avec la cotinine, avec la nicotine ou avec un mélange sur les récepteurs de la cotinine du cortex et du cervelet marqués par la [<sup>125</sup>I]-cotinine (Riah et al, 2000).

**3-2-1- Cortex.** Dans le cortex, le modèle 2-sites a été accepté ( $P \leq 0,05$ ) (Fig. 24 ; Tableau X). Les résultats d'inhibition montrent que l'administration de la solution saline, par rapport au traitement dit naïf, augmente le site de haute affinité (HA) et baisse le site de basse affinité (BA) (Fig. 24 ; Tableau X). L'administration de la solution saline n'a pas modifié la densité totale (HA+BA) des sites, suggérant une inter conversion des sites BA en sites HA (Tableau X). L'administration de la nicotine réduit la densité totale (HA+BA) des sites (Tableau X) et inhibe totalement le site HA (Fig. 24 ; Tableau X). L'administration de la cotinine n'affecte pas la densité totale (HA+BA) des sites (Tableau X) et réduit l'affinité du site BA (Fig. 24 ; Tableau X). Le mélange de nicotine et cotinine n'affecte pas la densité totale (HA+BA) (Tableau X) des sites et rétablit un site BA comparable à celui du traitement dit naïf (Fig. 24 ; Tableau X).

**3-2-2- Cervelet.** Dans le cervelet, le modèle 1-site a été accepté (Tableau X).

Les résultats d'inhibition montrent que l'administration de la solution saline, par rapport au traitement dit naïf, baisse la densité du site (Tableau X), tous les autres traitements s'opposent à l'effet salin, mais aucun n'a rétabli une densité comparable à celle du traitement dit naïf (Tableau X).

## LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LE RENFORCEMENT DES STIMULATIONS STRESSANTES ET ANTI-STRESSANTES



**Figure 26.** Effet additif de l'administration répétée de la solution saline isotonique, de la cotinine et de la nicotine sur l'ancrage de la p40H cérébrale. 7 rats ont reçu le traitement naïf (0) ou 11 IP sur 7 jours de la solution saline seule ou avec la nicotine (0,5) ; la cotinine (0,5 ou 1) et les 2 mélanges possibles. Ils ont été sacrifiés à l'arrêt du traitement et les membranes cérébrales extraites pour étudier, par Western Blot, le mécanisme de l'effet des traitements sur l'ancrage de la p40H cérébrale. En A, les protéines membranaires (1  $\mu$ g par piste) ont été étudiées, par Western Blot, comme décrit dans la légende de la Fig. 23. En B, l'AUC des bandes a été quantifiée, exprimée par rapport à Naïf et analysée par ANOVA deux voies sans réplication (Bloc : Sans nicotine x Avec nicotine). Bar ; SD ; \*, †,  $P \leq 0,05$ , respectivement par rapport à Naïf et à Sans nicotine, toutes doses confondues.

## LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LE RENFORCEMENT DES STIMULATIONS STRESSANTES ET ANTI-STRESSANTES

**Tableau X.** Effets opposés de l'administration répétée de la solution saline isotonique seule ou avec la nicotine sur les sites récepteurs de la cotinine : la cotinine reverse les effets de la nicotine dans le cortex et les renforce dans le cervelet.

Traitement	fmole/mg protéine	HA	kd 10 <sup>-9</sup> M	BA	kd 10 <sup>-6</sup> M
Cortex : la cotinine inhibe les effets de la nicotine					
Naïf	2,38	0,28±0,03	2,1±0,9	2,1±0,1	56±12
Saline	2,62	1,12±0,06*	0,09±0,03	1,5±0,1*	0,35±0,16
Nicotine	1,23	nd*	nd	1,23±0,1*	9±4
Cotinine	2,32	0,96±0,07*	0,08±0,03	1,36±0,1*	23±12
Mélange	2,6	0,7±0,1*	0,01±0,01	1,9±0,2	49±29
Cervelet : la cotinine renforce les effets de la nicotine					
Naïf	3,9	ND	ND	3,9±0,09	42±5
Saline	0,72	ND	ND	0,72±0,01*	187±6
Nicotine	1,28	ND	ND	1,28±0,24*	60±50
Cotinine	1,23	ND	ND	1,23±0,08*	18±6
Mélange	1,77	ND	ND	1,77±0,12*	28±8

ND, non détectable, \*,  $P \leq 0,05$  (Scheffé). 15 rats ont été traités et sacrifiés pour extraire les membranes du cortex et du cervelet et étudier, par des expériences d'inhibition (Riah et al., 2000), les sites récepteurs de la cotinine comme décrit dans la légende de la Fig. 24.

**3-3- Modulation à long terme des p40's.** Nous avons comparé l'effet de l'administration, 11 fois sur 7 jours, 22 fois sur 13 jours et 33 fois sur 19 jours, de la solution saline isotonique seule, avec la cotinine, avec la nicotine ou avec certains de leurs mélanges sur la p40 isolée par chromatographie d'affinité, au traitement dit naïf. Après la chromatographie d'affinité et séparation des protéines par SDS-PAGES, les gels ont été colorés au nitrate d'argent,



## **LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LE RENFORCEMENT DES STIMULATIONS STRESSANTES ET ANTI-STRESSANTES**

quantifiées par densimétrie et analysés comme décrit dans les légendes de la Fig. 25 et Tableau XI. Dans ces conditions de purification tous traitements confondus, pour n=18 pistes la moyenne de la DO est  $3,49 \pm 1,39$  millions ; la p40H représente  $17 \pm 6,6$  % ; p40L  $11,4 \pm 5,9$  % ; ZP40H  $40 \pm 14$  % et ZP40L  $11,5 \pm 5,9$  %.

**3-3-1- Effet sur l'AUC totale.** L'ANOVA montre que les traitements affectent, significativement ( $F_{4,13}=8,05$  ;  $P \leq 1,7.10^{-3}$ ), l'AUC totale. L'administration de la solution saline isotonique seule ( $t=4,86$  ;  $P \leq 0,01$ ), avec la nicotine ( $t=5,04$  ;  $P \leq 0,01$ ), avec la cotinine ( $t=4,98$  ;  $P \leq 0,01$ ) et avec les mélanges ( $t=3,91$  ;  $P \leq 0,05$ ) stimulent significativement l'AUC totale, les mélanges étant les moins actifs (Tableau XI).

**3-3-2- Effet sur la ZP40H.** L'ANOVA montre que les traitements affectent, significativement ( $F_{4,13}=11,7$  ;  $P \leq 3.10^{-4}$ ), la ZP40H. L'administration de la solution saline isotonique seule ( $t=5,48$  ;  $P \leq 0,05$ ), avec la nicotine ( $t=6,02$  ;  $P \leq 0,01$ ), avec la cotinine ( $t=4,15$  ;  $P \leq 0,05$ ) et les mélanges de nicotine et cotinine ( $t=6,05$  ;  $P \leq 0,001$ ) stimule significativement la ZP40H (Tableau XI).

**3-3-3- Effet sur la p40H.** L'ANOVA montre que les traitements affectent, significativement ( $F_{4,13}=4,75$  ;  $P \leq 0,014$ ), la p40H. L'administration de cotinine (0 ; 0,1 ; 0,5 et 1 mg.kg<sup>-1</sup>) affecte, significativement ( $F_{3,4}=9,12$  ;  $P \leq 0,029$ ), la p40H. L'inhibition de la p40H, à la dose 1 mg.kg<sup>-1</sup>, est significative ( $t=4,92$  ;  $P \leq 0,05$ ), la régression est significative ( $F_{1,4}=17,9$  ;  $P \leq 0,013$ ) et les déviations de la régression ne sont pas significatives ( $F_{2,4}=4,73$  ;  $P$  NS) (Fig. 25 A ; Tableau XI). La cotinine, toutes doses confondues, inhibe significativement la p40H par rapport au traitement dit naïf ( $t=4,07$  ;  $P \leq 0,05$ ) (Tableau XI). L'inhibition de la p40H par l'administration de la solution saline isotonique seule ( $t=2,85$  ;  $P$  NS) ou avec la nicotine ( $t=3,37$  ;  $P$  NS) n'atteint pas le seuil de signification (Fig. 25 B ; Tableau XI). Les mélanges de nicotine et de doses croissantes de cotinine ( $t=1,37$  ;  $P$  NS) n'affectent pas la p40H (Fig. 25 B ; Tableau XI).

## LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LE RENFORCEMENT DES STIMULATIONS STRESSANTES ET ANTI-STRESSANTES

**Tableau XI.** Effets de l'administration répétée de la solution saline isotonique seule ou avec la nicotine sur le rendement par chromatographie d'affinité : renforcement des effets opposés sur la p40H par la cotinine.

Action additive sur p40H : entre cotinine et solution saline isotonique						
Effet (%P40H)	Naïf	Saline	Cot 0,1	Cot 0,5	Cot 1	F <sub>4,5</sub> =14; P≤0,006 <sup>(1)</sup>
Régression	100±14	57±1	39±25*	49±7*	19±14**	F <sub>1,4</sub> =18; P≤0,02 <sup>(1)</sup>
Action synergique sur p40H : entre cotinine et nicotine						
Traitement	Naïf	Saline	Nicotine	Cotinine	Mélanges	Moyenne
DO x 10 <sup>-6</sup>	1,1±0,09	4,1±0,5**	4,5±0,4**	4,3±,2**	3,6±0,2*	3,49±1,4
ZP40H DO %	16±2	45±4**	51±4***	39±2*	49±3***	40±14
P40H DO %	27±4	16±2	13±2	11±3*	18±1	17±6,6
P40L DO %	18±2	10±4	7±1	18±2	5±1*	11±5,9
ZP40L DO %	39±1	29±4	29±3	33±4	27±3	31±5

<sup>(1)</sup>, Pour étudier la régression, le traitement naïf n'a pas été utilisé.

\* ; \*\* et \*\*\* respectivement  $P \leq 0,05$  ;  $0,01$  et  $0,001$  Par rapport à Naïf.

10 rats n'ont rien reçu (Naïf) ou reçu 11 IP sur 7 jours de solution saline isotonique seule (Saline) et avec la cotinine (Cot 0,1 ; Cot 0,5 et Cot 1 mg.kg<sup>-1</sup>). D'autres (10) rats ont reçu 11 IP sur 7 jours, 22 injections sur 13 jours, 33 injections sur 19 jours de solution saline isotonique seule (Saline), avec la nicotine 0,5 (Nicotine) ou les mélanges de nicotine 0,5 et de Cot 0,5 et Cot 5 (Mélanges). Les rats ont été sacrifiés 48 heures après l'arrêt du traitement pour extraire les membranes cérébrales, solubiliser les protéines et isoler les protéines réceptrices de la cotinine par chromatographie d'affinité (Riah et al., 2000). Les protéines ont été séparées par 12 % SDS-PAGE, colorées au bleu de Coomassie ou au nitrate d'argent et analysées par densimétrie. Les régions ZP40H, p40H, p40L et ZP40L ont été délimitées sur les gels et leur densité optique (DO) analysées par ANOVA.

## **LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LE RENFORCEMENT DES STIMULATIONS STRESSANTES ET ANTI-STRESSANTES**

**3-3-4- Effet sur la p40L.** L'ANOVA montre que les traitements affectent, significativement ( $F_{4,13}=4,34$  ;  $P \leq 0,02$ ), la p40L. L'effet de l'administration de la solution saline isotonique seule ( $t=1,78$  ;  $P NS$ ), avec la nicotine ( $t=2,30$  ;  $P NS$ ), avec la cotinine ( $t=0,02$  ;  $P NS$ ) et avec les mélanges ( $t=2,84$  ;  $P NS$ ) n'atteint pas le seuil de signification de Scheffé à 5 % (Seuil=3,6). Les mélanges inhibent par rapport à la cotinine ( $t=3,5$  ;  $P \leq 0,05$ ) la p40L (Fig. 25 ; Tableau XI).

**3-3-5- Effet sur la ZP40L.** L'ANOVA montre que les traitements n'affectent pas significativement ( $F_{4,13}=1,1$  ;  $P NS$ ), la ZP40L (Tableau XI).

**3-4- Modulation à long terme de l'ancrage de la p40.** Nous avons étudié l'effet de l'administré, 11 IP sur 7 jours de la solution saline seule, avec la nicotine (0,5), avec la cotinine (0,5 ; 1) ou avec les deux mélanges possibles, sur l'ancrage de la p40 par Western blot (Fig. 26 A). Les résultats montrent que la solution saline seule et avec la cotinine, toutes doses confondues, augmentent l'ancrage de la p40 et la nicotine augmente la réponse (Fig. 26 A). L'ANOVA montre que ces doses augmentent l'ancrage de la p40 par un mécanisme additif (Fig. 26 B).

## **DISCUSSION**

La cotinine, le dérivé majeur de la nicotine chez l'homme, est généralement admise comme l'indice le plus fiable pour mesurer l'exposition à la fumée de tabac (Bowman et al., 1959). Cependant, la cotinine est également mesurable chez le patient ni fumeur actif ni fumeur passif (Benowitz et al., 1983). Cette dernière sera rapportée dans la suite, cotinine endogène EndoC par opposition à la cotinine qui provient du métabolisme de la nicotine ou exogène ExoC. Bien que la cotinine n'ait pas été trouvée dans les aliments (Siegmund et al., 2001), ni l'origine de EndoC ni ses rôles physiologiques n'ont été étudiés. Des travaux, *in*

## **LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LE RENFORCEMENT DES STIMULATIONS STRESSANTES ET ANTI-STRESSANTES**

*vivo*, ont montré que l'administration de cotinine affecte la récompense des substances de dépendance. Par microdialyse chez le rat, le pré traitement par la cotinine inhibe l'effet de la nicotine et la cocaïne sur la libération de dopamine dans le noyau accumbens (Sziraki et al., 1999), atténue, comme la nicotine, l'incordination motrice de l'éthanol (Dar et al., 1993; Dar et al., 1994) et potentialise les effets de la nicotine (Riah et al., 1997; Riah et al., 1999). Son passage dans le cerveau (Riah et al., 1998), ses effets pharmacologiques différents (Dominiak et al., 1985; Risner et al., 1985; Goldberg et al., 1989; Smith et al., 1994; Vainio et al., 1998; Riah et al., 1999) et ses interactions avec les drogues nicotiniques (Riah et al., 1997; Riah et al., 1999) ont permis de postuler l'existence de ses récepteurs (Riah et al., 1998; Riah et al., 1999). Nous avons isolé une protéine de 40 kDa (p40), candidat potentiel pour ce rôle récepteur (Riah et al., 2000). L'analyse de la séquence des acides aminés de la p40 a montré une homologie significative avec des protéines humaines comme la p205 synoviale (Hain et al., 1996) et la p38 des fibroblastes (Bush et al., 1998) et des calculs rénaux (Binette and Binette, 1994). Celles-ci ont été impliquées dans les réactions immunitaires (Hain et al., 1996), inflammatoires (Binette and Binette, 1994; Hain et al., 1996) et la croissance cellulaire (Bush et al., 1998), suggérant un lien avec le monoxyde d'azote (NO). Ce même NO a été impliqué dans la récompense de la nicotine (Martin and Itzhak, 2000), responsable de l'initiation et du maintien de la dépendance tabagique. De plus, la récompense de la nicotine ne s'acquière qu'après son administration répétée (Clarke and Fibiger, 1987; Shoaib et al., 1994) dans un contexte complexe où le stress de la manutention des animaux (Schmitt and Hiemke, 1998), de l'administration saline isotonique (Lukic and Haldar, 1993; Weruaga et al., 2002), oxydant (Soto-Otero et al., 2002) et la potentialisation (synergie) des effets de la nicotine par sa conversion en cotinine (Riah et al., 1997; Riah et al., 1999) vont se développer. Pour définir le rôle de la cotinine et de la p40 dans ces processus, nous avons étudié la modulation de son passage dans le cerveau et de l'ancrage de son récepteur p40 dans

## **LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LE RENFORCEMENT DES STIMULATIONS STRESSANTES ET ANTI-STRESSANTES**

les membranes cérébrales par le stress de l'administration saline isotonique seule ou avec les alcaloïdes, séparément et en mélanges appropriés.

Nous avons montré que EndoC est détectable chez le rat non-traité et que EndoC et ExoC sont structurellement, par HPLC (Fig. 20 ; Tableau VIII), et immunologiquement, par RIA (Tableau VIII), indissociables. L'administration de la solution saline a inhibé les concentrations cérébrales de EndoC (Tableau VIII) et a stimulé, comme la cotinine, l'ancrage de la p40 dans les membranes du cerveau (Fig. 23 A). À l'exception de la précipitation de l'ancrage de la p40 par la cotinine, nous n'avons noté aucune différence qualitative ou quantitative entre la réponse à l'administration saline seule ou avec la cotinine (Fig. 23 B). Dans le plasma, les concentrations par RIA au temps 0-5 min ( $494 \pm 186$  ng/mL) situent nos animaux, par extrapolation aux humains, dans la catégorie des patients exposés à la fumée de tabac. L'administration de la solution saline n'a pas augmenté significativement les concentrations de EndoC plasmatique, à cause de la grande variabilité interindividuelle (Tableau VIII). La baisse significative des concentrations tissulaires de la cotinine cérébrale (Tableau VIII) suggère une inhibition de sa liaison dans ce tissu par un médiateur de stress. Ce médiateur serait capable d'inhiber sa liaison (Tableau VIII) et d'augmenter l'ancrage de son récepteur p40 dans les membranes de ce tissu, agissant comme la cotinine (Fig. 23). Le système cotinine-p40 est donc sensible au stress comme le système oxytocinergique (Lukic and Haldar, 1993), nitriergique (Weruaga et al., 2002) et benzodiazepinergique (Schmitt and Hiemke, 1998). Ces résultats rappellent les effets, non encore expliqués, du stress sur la baisse des concentrations de nicotine circulante sans modification des paramètres enzymatiques de sa conversion en cotinine (Winders et al., 1998). Nos résultats montrent que l'administration de la nicotine augmente les concentrations de cotinine cérébrales (Tableau IX). Cet effet de la nicotine pourrait expliquer sa conversion en cotinine dans la périphérie. La modulation opposée du transport de la cotinine dans le cerveau, respectivement, par le stress et par la

## **LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LE RENFORCEMENT DES STIMULATIONS STRESSANTES ET ANTI-STRESSANTES**

nicotine indique la participation de protéines de liaison au transport de la cotinine dans le cerveau (Tableau VIII ; IX). Pour supporter cette conclusion, nous avons isolé la p40 de l'aorte (Fig. 21), produit des anticorps anti-p40 et mis en évidence, par Western blot, la p40 dans d'autres tissus périphériques (Chapitre V-C). La baisse de l'astringence des conditions de la chromatographie d'affinité nous a permis de mieux visualiser les deux protéines majeures de 40 kDa (Fig. 21), que nous rapporterons dans la suite p40H et p40L, en faveur de la multiplicité des sites de la cotinine dans le cerveau (Fig. 25 ; Riah et al., 2000). L'analyse SDS-PAGE et la séquence des acides aminés du côté NH<sub>2</sub> terminal montrent que la p40 de l'aorte (Fig. 21 A), de la p40H et la p40L (Fig. 21 B) ont la même masse relative et la même séquence. Ce résultat suggère que les interactions avec le système cotinine-p40, aussi bien dans la périphérie que dans le cerveau, peuvent expliquer la modulation du transport de la cotinine dans le cerveau (Tableau VIII ; IX). En faveur de cette conclusion, la mecamlamine est inactive et l'hexamethonium inhibe totalement le transport de la cotinine dans le cerveau (Tableau IX). Ces résultats permettent de proposer que l'hexamethonium stimule la formation du complexe cotinine-p40 périphérique alors que le médiateur du stress de la solution saline inhibe et à l'inverse la nicotine stimule, la formation du complexe cotinine-p40 central. Ils rappellent nos travaux sur la synergie entre la nicotine et la cotinine d'un côté et entre l'hexamethonium et la cotinine de l'autre côté (Riah et al., 1999). Ils montrent que la formation du complexe cotinine-p40 central et périphérique (Tableau IX) pourrait expliquer la potentialisation de la toxicité de la cotinine, respectivement, par la nicotine et par l'hexamethonium (Riah et al., 1999).

L'analyse du profil HPLC montre la présence dans la p40H (Fig. 22 A) et l'absence dans la p40L (Fig. 22 B) d'un pic noté étoile, alors que tous les autres pics sont visibles (Fig. 22). Ce résultat indique une dégradation régulatrice de la p40H du côté COOH terminal dans ce cas, la p40L provient de la p40H ou, une maturation régulatrice par phosphorylation,

## **LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LE RENFORCEMENT DES STIMULATIONS STRESSANTES ET ANTI-STRESSANTES**

glucosylation, nitrosation donnant un peptide absorbant plus la lumière dans ce cas, la p40H provient de la p40L ou, deux protéines réceptrices indépendantes mais de la même famille dans ce cas, notre travail a le mérite de montrer, pour la première fois en accord avec les données du radioligand (Riah et al., 2000), une diversité de cette nouvelle famille de récepteurs de la cotinine. Nos résultats montre l'absence de la p40L de l'aorte et sa présence dans le cerveau (Fig. 21). Ces résultats suggèrent l'adaptation de la p40 centrale, chez le rat non traité, à une activité de stress basale. Cette conclusion est supportée par l'opposition des effets de l'administration saline et de l'administration de la nicotine sur les récepteurs de la cotinine (Fig. 24-25). L'induction des sites HA induite par l'administration de la solution saline est bloquée par l'administration de la nicotine (Fig. 24 ; Tableau X). Ce résultat est en accord avec la compétition de la nicotine pour les sites de la cotinine (Riah et al., 2000) et son blocage du renouvellement (turn-over) de ses récepteurs (Peng et al., 1994). Les résultats montrent que l'administration de cotinine augmente les effets de l'administration saline sur les sites HA (Fig. 24 ; Tableau X) et sur la p40H (Fig. 25 A ; Tableau XI). Ces résultats, en accord avec la notion de down régulation des récepteurs centraux lorsqu'ils sont exposés à leur agoniste (Creese and Sibley, 1981), supportent la conclusion que la p40 centrale fait partie du système de la récompense. Cette conclusion est démontrée par son adaptation au stress de l'administration saline isotonique seule ou avec la cotinine (Fig. 23-26; Tableau VIII ; XI) et à l'administration de la nicotine (Fig. 24-26 ; Tableau IX ; XI). Cette conclusion a également été proposée dans une autre étude sur la libération de dopamine (Sziraki et al., 1999). Ces résultats favorisent la conclusion que la p40L provient de la p40H, suite à une coupure régulatrice du côté COOH terminal (Fig. 21-22) et son internalisation ou séquestration sous l'effet de l'administration de cotinine (Fig. 25 A). Cependant, les méthodes de la présente étude ne nous permettent pas de conclure définitivement sur l'origine de la cotinine identifiée chez le rat non traité et si la p40 est réellement séquestrée ou non.

## **LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LE RENFORCEMENT DES STIMULATIONS STRESSANTES ET ANTI-STRESSANTES**

Les arguments suivants sont en faveur de son origine endogène : i) la cotinine a été détectée chez les patients non-fumeurs non-exposés, internés et sous-surveillance médicale (Benowitz et al., 1983) ; ii) nos expériences ont été réalisées à différents moments et avec différents lots de rats, il ne devrait y avoir aucune place pour l'erreur systématique ; iii) l'estimation de la dose, en cotinine équivalent d'origine artefact, donne des valeurs nettement supérieures dans le schéma administration aiguë par rapport au schéma administration répétée. En administration aiguë l'estimation donne une dose supérieure à  $1 \text{ mg.kg}^{-1}$  lors de l'étude du transport (Tableau VIII ; IX) et de  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$  lors de l'étude de l'ancrage de la p40 (Fig. 23), soit au moins  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$  nicotine, or cette dose de nicotine est proche de la  $DL_{50}$  (Riah et al., 1999) et nous n'avons jamais noté de mortalité dans l'animalerie. Au contraire, dans les traitements répétitifs la dose équivalente est inférieure à 0,5 lors de l'étude de la p40 par chromatographie d'affinité (Fig. 25 A) et par Western Blot (Fig. 26). Ces arguments seraient incompatibles avec une origine artefact quoi qu'il en soit, la modulation opposée de son transport dans le cerveau, par la solution saline et par la nicotine, démontre que le système cotinine-p40 est sensible au stress et l'action de la nicotine (Tableau VIII ; IX). En accord avec cette conclusion, la cotinine précipite (Fig. 23) et augmente en addition avec l'administration saline (Fig. 24-26) l'effet du médiateur de stress sur ses récepteurs et son transport. La cotinine devrait être, en accord avec une étude chez l'homme (Pianezza et al., 1998), un facteur de rechute cependant, cette conclusion n'a pas été atteinte dans d'autres travaux, car la cotinine a été interprétée par la consommation de nicotine.

L'administration de la nicotine a affecté, de manière opposée, tous les effets de l'administration de la solution saline, un modèle de stress (Schmitt and Hiemke, 1998; Lukic and Haldar, 1993; Weruaga et al., 2002). Cette opposition montre que l'activité anti-stress recherchée de la nicotine (Pomerleau et al., 1990; Pomerleau and Pomerleau, 1990a, b) passe par le système cotinine-p40. Ces deux alcaloïdes semblent produire un effet anti-stress sur la



## **LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LE RENFORCEMENT DES STIMULATIONS STRESSANTES ET ANTI-STRESSANTES**

biodisponibilité de la cotinine (Tableau IX), sur la p40 (Fig. 25 B) et sur les sites de la cotinine (Fig. 24 ; Tableau X). Le fait d'observer des adaptations dans les sites de haute et de basse affinité et que l'adaptation se fait dans des directions opposées suivant la région considérée (Tableau X) montre que la récompense des substances de dépendance, y compris de la nicotine, repose sur l'activité de plusieurs régions cérébrale et ne peut être confiné à aucune structure particulière (Koob, 1992; Stolerman, 1993). Dans les deux cas un ou deux sites, la nicotine a opposé à l'effet du stress de la solution saline (Tableau X). L'effet de la cotinine sur ses sites de liaison doit être remis dans le contexte de la multiplicité des sites et de la dose utilisée (100 fois la nicotine). Elle a reproduit l'effet de la nicotine sur le site BA, visualisé plus facilement par le modèle 1 site du cervelet (Tableau X). Elle a protégé l'effet de la solution saline sur le site HA, visualisé plus facilement par le modèle 2 sites du cortex (Tableau X). Ces résultats rappellent la complexité de l'étude des sites récepteurs de la nicotine (Nordberg et al., 1985; Larsson et al., 1986; Sanderson et al., 1993).

Pour évaluer les protéines réceptrices de la cotinine dans ces processus, nous avons découpé en zones ZP40H, ZP40L, p40H et p40L les régions susceptibles de montrer des récepteurs ou précurseurs (ZP40H) ou des récepteurs ou produits de dégradation (ZP40L) de la p40. L'expression des résultats de chaque zone en % des protéines totale visait standardiser les pistes d'un gel SDS-PAGE à l'autre. Les résultats obtenus confirment qu'aucun traitement n'affecte la ZP40L (Tableau XI), ce qui favorise l'hypothèse de la dégradation de la p40H en p40L et sa séquestration. La solution saline stimule significativement les protéines totales et la ZP40H (Tableau XI), suggérant la présence de récepteurs précurseurs dans cette zone. La nicotine stimule, comme la solution saline, l'AUC total, la ZP40H, mais n'inhibe pas la p40H (Fig. 25 A ; Tableau XI). En présence de cotinine dans les mélanges, elle stimule moins fortement l'AUC totales (Tableau XI) que la Zp40H (Fig. 25 B) et rétablit la p40H du traitement dit naïf. Ces résultats démontrent une potentialisation, par la cotinine, de l'action

## **LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LE RENFORCEMENT DES STIMULATIONS STRESSANTES ET ANTI-STRESSANTES**

inhibitrice de la nicotine sur la p40H (Fig. 25 ; Tableau XI). L'absence d'effet de la nicotine  $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$  sur la p40H suggère que l'effet synergique de la nicotine et de la cotinine sur la p40H a pris place. Comme les techniques de chromatographie d'affinité et radioligand sont basées sur le principe d'affinité nous devrions arriver, en principe, à la même conclusion ! Cependant, les traitements peuvent affecter plusieurs cibles différentes et leur affinité, il est par conséquent difficile, voir impossible, de savoir par la technique du radioligand quelle cible a été modifiée, alors que l'analyse SDS-PAGE des protéines isolées par affinité le permet, dans la mesure où la résolution et l'abondance des cibles sont suffisantes. Les résultats obtenus avec ces deux techniques montrent que le mélange des deux alcaloïde donne un état plus naïf que l'état dit naïf comme le montre la restauration des sites BA (Tableau X) et de la p40LH (Fig. 25). De plus, les deux techniques suggèrent que les modulations observées sont le résultat de modifications d'affinité et de densité des récepteurs (Fig. 24-25 ; Tableau X).

Pour savoir par quel mécanisme les mélanges de nicotine et de cotinine stimulent l'ancrage de la p40H dans les membranes cérébrales (Fig. 25 B), nous avons étudié, par Western blot, l'effet des traitements par la solution saline, la nicotine ( $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ ), la cotinine ( $0,5 ; 1 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) et leurs mélanges (Fig. 26 A) sur la p40H. Les résultats obtenus montrent que la solution saline et la cotinine, toutes doses confondues, stimulent l'ancrage de la p40 dans les membranes (Fig. 26 B) et que la présence de nicotine dans les mélanges augmente par un mécanisme additif l'ancrage de la p40H (Fig. 26 A-B). Ces résultats confirment que les traitements affectent la densité et l'affinité des récepteurs de la cotinine. L'augmentation de l'ancrage de la p40H est en accord avec l'effet de ralentissement, par la nicotine, de la dégradation de ses récepteurs (Peng et al., 1994).

Pour savoir si le système cotinine-p40 peut contribuer à la récompense de la nicotine en absence de stress expérimental supplémentaire, nous avons évalué l'effet de la présence et

## **LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LE RENFORCEMENT DES STIMULATIONS STRESSANTES ET ANTI-STRESSANTES**

du retrait de la cotinine sur la consommation de la nicotine dans l'eau de boisson. Les résultats obtenus indiquent que sa présence inhibe la consommation de la nicotine et au contraire son retrait stimule, temporairement, la consommation de nicotine (Chapitre V-A). Ainsi, les effets de la nicotine, responsable de son auto-administration, peuvent être potentialisé par son métabolite, la cotinine. Cette hypothèse est en accord avec les travaux chez le rat dans le test de la place préférence (Clarke and Fibiger, 1987; Shoaib et al., 1994) et chez l'homme où la déficience dans l'allèle CYP2A6, l'enzyme responsable de la conversion de la nicotine en cotinine, a été associé à une dépendance tabagique plus faible (Pianezza et al., 1998). De plus, ils sont en accord avec l'hypothèse que le NO intervient dans la récompense de la nicotine et non dans son aversion (Martin and Itzhak, 2000).

Dans l'ensemble, les résultats présentés sont des considérations pharmacocinétiques, pharmacodynamiques et comportementales pour illustrer les rôles opposés de la cotinine dans l'augmentation, par une action additive, du stress de l'administration saline isotonique et, par potentialisation (synergie ou supra additive), les activités de la nicotine responsable de la dépendance tabagique. Ils permettent de conclure que ce rôle nous semble fondamental dans l'acquisition et le maintien de la dépendance tabagique.

**LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LA  
LIBÉRATION DES NEUROMÉDIATEURS**

**CHAPITRE IV. LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS  
LA LIBÉRATION DES NEUROMÉDIATEURS**

# **LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LA LIBÉRATION DES NEUROMÉDIATEURS**

## **Identification of a non nicotinic, p40 antibodies blocked cotinine-induced dopamine release response in rat striatal synaptosome and its potentiation by mecamylamine and methyllycaconitine**

### **ABSTRACT**

The pharmacology and receptors of nicotine and its main derivative, cotinine, are distinct. The present study was conducted to isolate in a first step a "specific" effect of cotinine on [3H]-noradrenaline (NA) and [3H]-dopamine (DA) release. The comparison of effects sensitive to nM concentrations of cotinine in five areas of rat brain has permitted to identify DA release in striatum and NA release in cerebellum. DA release desensitized much more rapidly than NA release. In a second step, we have showed that mecamylamine, the irreversible antagonist of nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs), had potentiation of effects of cotinine  $\mu\text{M}$  on DA release. In a third step, we have confirmed the potentiation of DA by mecamylamine and methyllycaconitine, another antagonist reversible but more efficient at nAChRs. These results demonstrate the non-nicotinic nature of DA release induced by cotinine. Finally, we have confirmed, by total block of the response with anti-p40 antibodies, the non-nicotinic nature of cotinine effects on DA release in the striatum.

These results are discussed in light of literature data on the subject.

**Key Words:** Nicotine and cotinine receptors; noradrenaline and dopamine release; reward and dependence; therapy; brain and rat.

# **LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LA LIBÉRATION DES NEUROMÉDIATEURS**

**Identification d'une réponse de libération de dopamine non nicotinique induite par la cotinine et bloquée par les anticorps anti-p40 dans les synaptosomes du striatum du rat et sa potentialisation par la mécamylamine et la methyllycaconitine**

## **RÉSUMÉ**

La pharmacologie et les récepteurs de la nicotine et de son dérivé, la cotinine, sont différents. La présente étude a été conduite pour isoler dans un premier temps un effet "spécifique" de la cotinine sur la libération de la [3H]-noradrénaline (NA) et de la [3H]-dopamine (DA). La comparaison des effets sensibles aux concentrations nM de cotinine sur cinq régions cérébrales du rat a permis d'identifier une libération de DA dans le striatum et de NA dans le cervelet. La libération de DA désensibilise plus rapidement que la libération de NA. Dans un second temps, nous avons montré la potentialisation des effets de la cotinine  $\mu\text{M}$  sur la libération de DA par l'antagoniste des récepteurs nicotiniques (nAChRs) irréversible mécamylamine. Dans un troisième temps, nous avons confirmé la potentialisation de la libération de DA par la mécamylamine et la methyllycaconitine, un autre antagoniste réversible mais plus efficace des nAChRs. Ces résultats démontrent la nature non nicotinique de la libération de DA provoquée par la cotinine. Nous avons confirmé, par le blocage total de la réponse avec les anticorps anti-p40, les effets non nicotiniques de la cotinine sur la libération de la DA dans le striatum.

Ces résultats sont discutés à la lumière des données de la littérature sur le sujet.

**Mots clés :** récepteur de la nicotine et de la cotinine ; libération de noradrénaline et de dopamine ; récompense et dépendance ; thérapeutiques ; cerveau et rat.

# **LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LA LIBÉRATION DES NEUROMÉDIATEURS**

## **INTRODUCTION**

La nicotine stimule la libération de nombreux transmetteurs dans le cerveau de rat par une action directe sur les terminaisons nerveuses. L'attention a été portée surtout sur le système dopaminergique nigrostrié et plusieurs équipes ont caractérisé la pharmacologie de la libération de dopamine (DA) et de noradrénaline (NA) par la nicotine dans des synaptosomes ou coupes de cerveau. La libération de DA provoquée par la nicotine  $\mu\text{M}$  dans le nigrostriatum est dépendante du calcium externe (Grady et al., 1992; el-Bizri and Clarke, 1994) et médiée par les récepteurs nicotiques à l'acetylcholine (nAChRs). La réponse est donc stéréo sélective (Rapier et al., 1988), susceptible à la désensibilisation (Rapier et al., 1988; Grady et al., 1994; Rowell and Hillebrand, 1994), reproduite par un nombre d'agonistes nicotiques et inhibée par certain antagonistes des nAChRs (Rapier et al., 1988; Grady et al., 1992; el-Bizri and Clarke, 1994; Grady et al., 1994; Rowell and Hillebrand, 1994; Clarke and Reuben, 1996).

La nicotine agit également sur l'hippocampe isolé du rat et stimule in vitro la libération de la NA (Arqueros et al., 1978; Snell and Johnson, 1989). Avant ces deux dernière études, les effets de la nicotine sur la libération de NA étaient obtenus à des concentrations très élevées ( $\geq 500 \mu\text{M}$ ) et présentaient des propriétés suggérant une action intracellulaire de type tyramine. Par la suite, des concentrations plus faibles (10 et 100  $\mu\text{M}$ ) de nicotine ont été capable de stimuler la libération de NA de coupes perfusées (Snell and Johnson, 1989). Cet effet était bloqué par l'antagoniste des nAChRs mecamylamine, mais une action directe de la nicotine sur les terminaisons nerveuses n'a pas été démontrée. Une autre étude a montré que cette action de la nicotine sur la NA de l'hippocampe pourrait être largement indirecte (Sacaan et al., 1995). Une étude comparant en parallèle les effets de la nicotine sur la libération de NA de l'hippocampe et de la DA du striatum sur des préparations

## **LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LA LIBÉRATION DES NEUROMÉDIATEURS**

synaptosomales a permis de conclure que la pharmacologie du sous-type de nAChRs médiateur de chacune de ces deux réponses était différente (Clarke and Reuben, 1996).

Les sous-types de nAChRs médiateurs de la libération de la DA dans le striatum et de la NA dans l'hippocampe ne sont pas connus, mais des expériences d'hybridation in situ suggèrent que ces nAChRs sont différents. Ceci étant, des neurones dopaminergiques présumés d'origine nigrostriée expriment en abondance le messenger des sous-unités  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  et  $\beta 2$  et faiblement  $\alpha 3$  (Wada et al., 1989; Wada et al., 1990), alors que le Locus Coeruleus, d'où émergent les projections NA vers l'hippocampe, exprime en abondance le messenger  $\alpha 3$  et moyennement les messagers  $\beta 2$  et  $\beta 4$  (Wada et al., 1989; Wada et al., 1990). La comparaison de la pharmacologie des récepteurs recombinants et le paterne d'expression anatomique des messagers des sous-unités des nAChRs suggèrent que le sous-type de nAChRs contenant les sous-unités  $\alpha 3$  et  $\beta 4$  module la libération de NA de l'hippocampe, alors que le sous-type de nAChRs contenant les sous-unités  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  et  $\beta 2$  module la libération de la DA du striatum (Clarke and Reuben, 1996). Cependant, cette conclusion devrait être prise avec beaucoup de précautions. En effet, la pharmacologie de la libération de DA ne se superpose à la pharmacologie d'aucune combinaison de sous-unité (Clarke and Reuben, 1996) et la conclusion est surtout supportée par la fixation de la [3H]-nicotine (Clarke et al., 1984) présumée résulter de la combinaison  $\alpha 4\beta 2$  (Whiting and Lindstrom, 1988; Flores et al., 1992). D'autre part, l'identité du nAChRs modulant la libération de la DA et de la NA devrait être supportée par la pharmacologie et / ou par les anticorps des sous-unités, car le messenger ne renseigne avec exactitude ni sur l'abondance de la protéine ni sur sa localisation dans le neurone.

Les nAChRs du cerveau sont très diversifiés et largement exprimés. Cependant, peu de réponses nicotiques ont été caractérisées d'un point de vue pharmacologique et à présent, on



## LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LA LIBÉRATION DES NEUROMÉDIATEURS

ne sait pas si les types de nAChRs modulant la libération des neuromédiateurs sont exprimés par d'autres populations neuronales. Deux autres réponses nicotiques, à côté de la libération de NA, ont été attribuées provisoirement à la combinaison  $\alpha 3\beta 4$ . L'une décrite dans l'habenula médiane diffère de la libération de NA dans sa sensibilité à la mécamylamine et à la dihydro- $\beta$ -érytroïdine et dans les propriétés du canal formé par le récepteur  $\alpha 3\beta 4$  exprimé dans les oocytes du Xénope (Mulle et al., 1991). L'autre décrite dans des cultures de neurones de l'hippocampe n'a pas été largement caractérisée (Alkondon and Albuquerque, 1993). D'autres réponses nicotiques centrales (Mulle et al., 1991; Vidal and Changeux, 1993) sont clairement différentes de la libération de NA.

Ainsi, les conclusions sur le sous-type de nAChRs modulant la libération des neuromédiateurs sont provisoires et *in vivo*, la nicotine est rapidement métabolisée en cotinine (Bowman et al., 1959). Ce dérivé a une demi-vie beaucoup plus longue que celle de la nicotine (Benowitz et al., 1983). Le récepteur de la cotinine (p40) lie également la nicotine, sa pharmacologie n'est purement ni muscarinique ni nicotinique et la séquence de ses acides aminés montre qu'il n'est pas un nAChRs (Riah et al., 2000). De plus, la toxicité de la cotinine est potentialisée par les antagonistes des nAChRs (Dwoskin et al., 1999) et, *in vitro* la cotinine stimule les nAChRs et libère la DA (Dwoskin et al., 1999) et *in vivo*, le pré-traitement par la cotinine ( $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) inhibe la libération de la DA induite par la nicotine et la cocaïne. Un traitement par la cotinine ( $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) down régule le récepteur p40 alors qu'en présence de nicotine, la p40 est up régulée (Chapitre III). Ces résultats suggérant que la cotinine agit sur un composant du système de la récompense (Sziraki et al., 1999) et par conséquent, les récepteurs de la cotinine (p40) sont impliqués dans les mécanismes de la récompense (Sziraki et al., 1999). En accord avec cette hypothèse, nous avons proposé la mobilisation de la cotinine endogène sous l'action de l'injection d'une solution saline

# **LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LA LIBÉRATION DES NEUROMÉDIATEURS**

isotonique et la contribution de la cotinine à l'activité anti-stress de la nicotine, visible à l'échelle du récepteur p40.

Dans ce travail, nous avons étudié dans un premier temps la libération de la DA et de la NA dans cinq régions cérébrales chez le rat afin d'isoler une réponse spécifique à l'action de la cotinine. Dans un second temps, nous avons confirmé la potentialisation, par les antagonistes des nAChRs, de l'action de la cotinine sur la libération de la DA dans le striatum. Enfin, l'aptitude des anticorps anti-récepteurs de la cotinine à inhiber cette activité a été établie.

## **MATÉRIELS ET MÉTHODES**

Des rats mâles Sprague-Dawley (IFFA-Credo France) de 300-400 g ont été maintenus au moins trois jours avant l'expérimentation dans l'animalerie de la Faculté des Sciences Pharmaceutique (Toulouse) à une température de  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  et une humidité relative de 72%. Ils étaient naïfs à tout traitement. Les animaux avaient un accès *ad libitum* à la nourriture standard commercial (Rat A04) et au biberon d'eau. Les protocoles expérimentaux, impliquant les animaux, étaient en accord avec les directives du *Guide pour la Protection et de l'Usage des Animaux de Laboratoire*. Ils ont été approuvés par le Comité Usage et la Protection des Animaux de Laboratoire de l'Université Paul Sabatier.

Le protocole de libération de la DA et de la NA a été réalisé comme décrit par Clarke et Reuben (Clarke and Reuben, 1996). Les animaux sont sacrifiés par élongation des vertèbres cervicales, le cerveau prélevé, lavé dans le tampon de dissection (saccharose 0,32 M-Hepes 5 mM) à  $4^{\circ}\text{C}$ , les régions cérébrales disséquées et homogénéisées dans 20 volumes de tampon de dissection. Après une centrifugation de 10 min (3000 rpm ; rotor Beckman JA20), le

## **LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LA LIBÉRATION DES NEUROMÉDIATEURS**

surnageant est à nouveau centrifugé 20 min (10000 rpm). Le culot riche en synaptosomes est remis en suspension à raison de 5 ml par g de tissu initial dans le tampon de perfusion (mM : NaCl, 128 ; KCl, 2,4 ; CaCl<sub>2</sub>, 3,2 ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2 ; MgSO<sub>4</sub>, 0,6 ; HEPES, 25 ; glucose, 10, acide ascorbique, 1 ; pargyline, 0,01). Les synaptosomes sont ensuite incubés 10 min à 37 °C avec le neuromédiateur radioactif (0,1-0,2  $\mu$ M). L'incubation est arrêtée par centrifugation 5 min à 3000 rpm, le culot repris dans le même volume de tampon, 100  $\mu$ l sont déposés par filtre type A/E (Gelman) pré-monté dans les chambres de perfusion (Swinnex ; Millipore). Les synaptosomes sont lavés 35 min avec le tampon de perfusion avec un débit de 0,4 ml/min maintenu par la pompe péristaltique. On collecte une dizaine de fractions dans des fioles à scintillation de 5 ml (Beckman) qui serviront à établir la moyenne de la ligne de base pour chaque canal avant d'injecter grâce à une seringue 25 G (Becton-Dickinson) le tampon comme contrôle ou l'agoniste. On collecte à nouveau une dizaine de fractions pour le calcul de l'effet, exprimé en % de la ligne de base. Généralement la ligne de base s'établit au bout de 25-30 min et l'effet est observé au bout de 1-5 min. Pour les expériences d'inhibition, les antagonistes sont présents durant toutes les périodes : lavage, administration de l'agoniste et effet. Dans les expériences d'inhibition avec les anticorps des récepteurs de la cotinine, le sérum immun (1-10  $\mu$ l) ou contrôle (10  $\mu$ l) est mis avec les synaptosomes durant la période d'incubation avec le neuromédiateur radioactif. Les fractions sont mélangées avec 4 ml de liquide de scintillation (Beckman) et les fioles placées dans un compteur beta (Beckman). La pargyline, un inhibiteur des monoamines oxydases (MAO), préserve les neuromédiateurs de la dégradation et l'acide ascorbique des oxydations. Dans ces conditions, la radioactivité collectée correspond au neuromédiateur à plus de 80%. De plus, le système de perfusion et des synaptosomes mesure l'action directe sur les terminaisons nerveuses et les effets sur la

# LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LA LIBÉRATION DES NEUROMÉDIATEURS

libération du neuromédiateur et pas sur la recapture du neuromédiateur (Clarke and Reuben, 1996). L'expression des effets par l'aire sous la courbe (AUC) ou la hauteur du pic de libération produit le même résultat (Clarke and Reuben, 1996). Les données ont été soumises à l'analyse de variance (ANOVA) et les effets jugés par les tests de Student. Une probabilité  $P \leq 0,05$  est considérée significative.

## RÉSULTATS

### **I- Effet de la cotinine sur la libération de la NA et de la DA dans les différentes régions cérébrales**

**Effets sur la NA.** La cotinine affecte significativement la libération de la NA dans le cortex ( $F_{3,40} = 3,76$  ;  $P \leq 0,02$ ), le striatum ( $F_{3,40} = 3$  ;  $P \leq 0,04$ ), le bulbe ( $F_{3,40} = 4,56$  ;  $P \leq 0,01$ ), le caudate-putamen ( $F_{3,40} = 2,92$  ;  $P \leq 0,05$ ) et le cervelet ( $F_{3,40} = 8,74$  ;  $P \leq 0,0001$ ). Au seuil de Student, l'effet des concentrations de la cotinine n'atteint pas la signification dans le caudate-putamen et le bulbe ( $t = 1,93$  à  $10^{-3}$  M ;  $0,05 \leq P \leq 0,10$ ). Au contraire, il atteint la signification dans le striatum ( $t = 2,26$  à  $10^{-5}$  M ;  $P \leq 0,05$ ), le cortex ( $t = 2,08$  à  $10^{-5}$  M ;  $P \leq 0,05$ ) et le cervelet ( $t = 3,45$  à  $10^{-5}$  M ;  $P \leq 0,01$ ) (Fig. 27).

**Effet sur la DA.** L'effet de la cotinine sur la libération de la DA est significatif dans le cortex ( $F_{6,101} = 2,22$  ;  $P \leq 0,03$ ), le cervelet ( $F_{11,96} = 15,96$  ;  $P \leq 3.10^{-17}$ ) et le striatum ( $F_{10,171} = 4,57$  ;  $P \leq 10^{-5}$ ). Il n'est pas significatif dans le caudate-putamen ( $F_{4,68} = 2,39$  ;  $P \leq 0,059$ ) et le bulbe ( $F_{6,108} = 1,25$  ;  $P \leq 0,3$ ). Au seuil de Student, l'effet des concentrations de la cotinine atteint la signification dans le striatum ( $t \geq 3,5$  à  $10^{-8}$  M ;  $P \leq 0,01$ ), le cortex ( $t \geq 2,7$  à  $10^{-6}$  M ;  $P \leq 0,01$ ) et le cervelet ( $t \geq 3,5$  à  $10^{-9}$  et  $10^{-6}$  M ;  $P \leq 0,01$ ) (Fig. 27). Les résultats montrent que la réponse mesurée « libération des neuromédiateurs » est relative et représente la résultante d'une libération et d'une capture (Fig. 27) :

## LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LA LIBÉRATION DES NEUROMÉDIATEURS

*Dans l'intervalle de concentrations [nM, µM].* La cotinine stimule de manière non significative la capture de NA dans toutes les régions et significative pour la DA dans le cervelet ( $0,05 \leq P \leq 0,01$ ) (Fig. 27). La libération de noradrénaline est significative dans le cervelet ( $P \leq 0,01$  ; Fig. 27) et la libération de DA est significative dans le cortex ( $P \leq 0,01$  à  $1 \mu\text{M}$  ; Fig. 27) et le striatum ( $P \leq 0,01$  à  $10 \text{ nM}$  ; Fig. 29). La libération de DA désensibilise dès  $50 \text{ nM}$  dans le striatum (Fig. 29).

*Dans l'intervalle de concentrations [µM, mM].* On observe dès les concentrations supérieures à  $\mu\text{M}$  une désensibilisation de la capture de DA dans le cervelet ( $\hat{a} \geq 50 \mu\text{M}$ ), de la libération de DA dans le cortex ( $\hat{a} \geq 10 \mu\text{M}$ ) et de la NA dans le cervelet. La libération de NA dans les autres régions ne montre pas une désensibilisation évidente (Fig. 27).

### *Classification des régions suivant l' $E_{\text{max}}$ de la NA.*

L'effet maximum ( $E_{\text{max}}$ ) de la libération de NA permet de proposer une classification de l'amplitude de la réponse des régions : striatum (455 %)  $\geq$  bulbe (349)  $\geq$  cortex (311)  $\geq$  caudate-putamen (289)  $\geq$  cervelet (211).

*Classification des régions suivant l' $EC_{50}$  de la NA.* La concentration produisant 50 % de l' $E_{\text{max}}$  ( $EC_{50}$ ) permet de proposer la classification suivante de la sensibilité des régions : cervelet (nM)  $\geq$  à toutes les autres régions.

*Classification des régions suivant l' $E_{\text{max}}$  de la DA.* L' $E_{\text{max}}$  permet de proposer : striatum (202 %) = cortex (211)  $\geq$  cervelet (capture c'est-à-dire des valeurs  $\leq 100$  % ; Fig. 27).

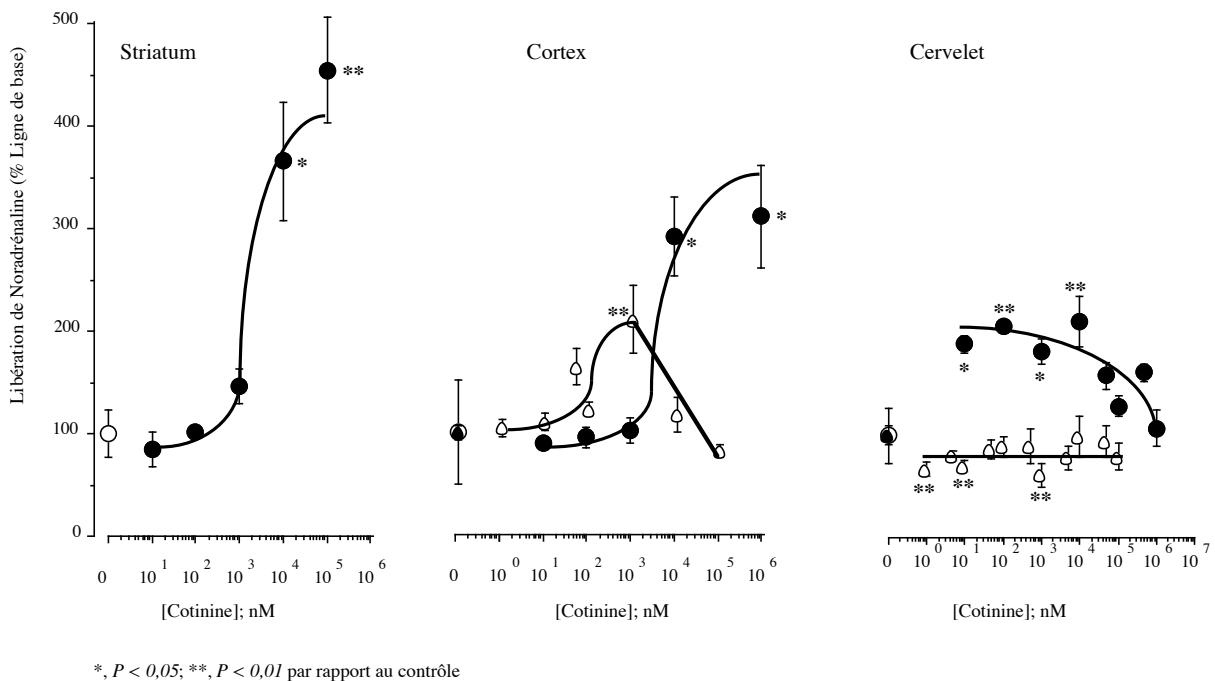
*Classification des régions suivant l' $EC_{50}$  de la DA.* L' $EC_{50}$  permet de proposer cervelet (nM) = striatum (nM)  $\geq$  cortex ( $\mu\text{M}$ ).

Ces résultats montrent que la cotinine module la libération et la capture de la NA et de la DA : La capture de la NA n'atteint pas la signification, celle de la DA atteint la signification dans le cervelet.

# LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LA LIBÉRATION DES NEUROMÉDIATEURS

La libération de la NA s'exprime dans toutes les régions. La libération de la DA s'exprime dans le striatum et le cortex et sa capture dans le cervelet.

En résumé : dans le nM, la cotinine libère la NA et capture la DA dans le cervelet et libère la DA dans le striatum. Aux plus fortes concentrations, elle libère la NA dans toutes les régions et la DA dans le cortex. Les effets sur la DA désensibilisent plus rapidement que ceux sur la NA.



**Figure 27.** Comparaison des effets dose réponse de la cotinine sur la libération de la NA et de la DA dans les synaptosomes de cinq régions du cerveau chez le rat. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  écart à la moyenne du pic de libération, calculé en % de la ligne de base et normalisé, de la NA (rond plein,  $n = 4$ ) et de DA (triangle vide) dans le cortex ( $n = 8-15$ ) et le cervelet ( $n = 5-13$ ). Les valeurs du contrôle sont indiquées par le zéro des abscisses. Les probabilités sont indiquées dans la figure. Student après ANOVA.

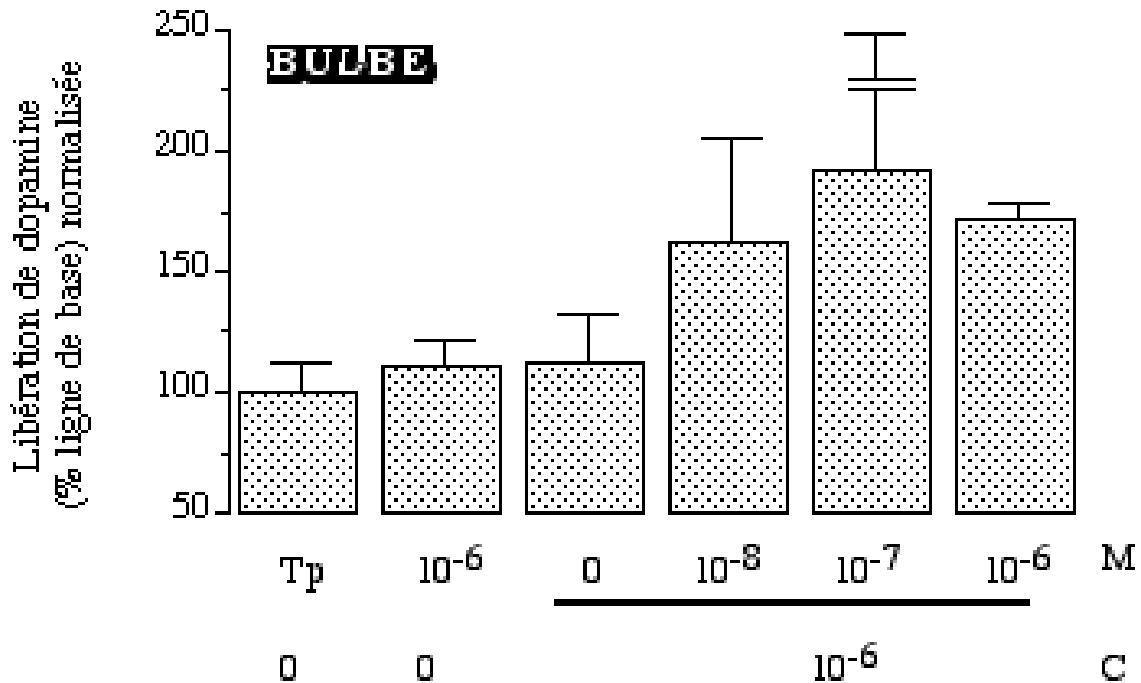
# LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LA LIBÉRATION DES NEUROMÉDIATEURS

**II- Potentialisation des effets de la cotinine  $\mu\text{M}$  sur la libération de la DA par la mécamylamine** Nous avons évalué l'effet de la mécamylamine, un antagoniste irréversible des nAChRs neuronaux, sur la libération de DA provoquée par la cotinine. Nous avons utilisé une concentration de cotinine de  $1 \mu\text{M}$  dans toutes ces régions. La présence de cet antagoniste n'a pas eu d'effet significatif sur la libération de la DA basale et provoquée par la cotinine, exception faite pour le bulbe (Fig. 28) : l'analyse de variance montre, en utilisant deux traitements avec et sans antagoniste, une différence à la limite de la signification ( $F_{1,30} = 3,9$  ;  $P \leq 0,057$ ) et la comparaison des moyennes entre avec et sans antagoniste est à la limite de la signification ( $t = 1,98$  ;  $P \leq 0,057$ ).

La présence de l'antagoniste potentialise donc légèrement l'effet de la cotinine  $\mu\text{M}$  sur la libération de la DA, au moins dans le bulbe.

**III- Rôle de la p40 dans la libération de la DA dans le striatum** Bien que tous les effets que nous avons décrits sur la libération et la capture de la DA et de la NA suivant les régions aux concentrations de cotinine  $\geq \mu\text{M}$  méritent d'être caractérisés précisément, nous avons accordé notre attention au rôle des récepteurs de la cotinine (p40) dans l'activité de libération de la DA dans le striatum. D'autre part, la libération de NA dans le cervelet et de la DA dans le striatum pourrait dépendre du même récepteur.

## LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LA LIBÉRATION DES NEUROMÉDIATEURS



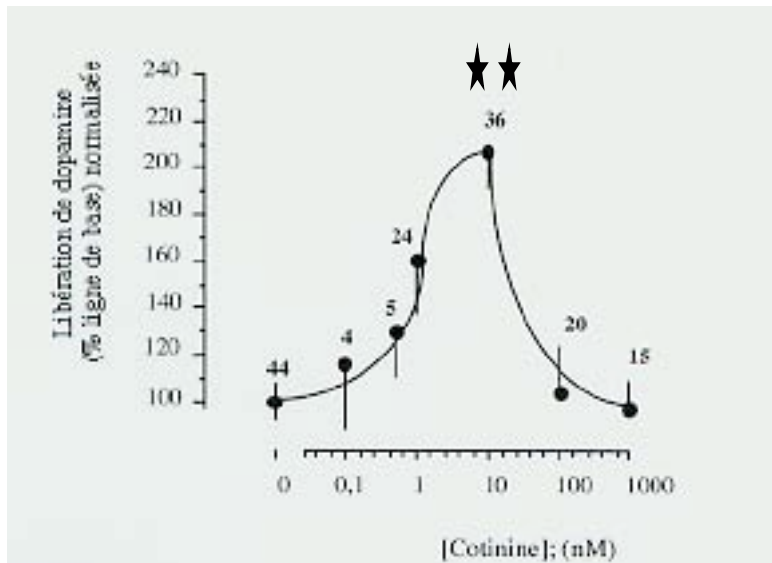
**Figure 28.** Potentialisation par la mécamylamine des effets de la cotinine sur la libération de DA dans le bulbe. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  écart à la moyenne du pic de libération, calculé en % de la ligne de base et normalisé de 5 expériences. Abréviations : Tp, tampon ; M, mécamylamine ; C, cotinine ; étoile ,  $P \leq 0,06$  entre avec et sans mécamylamine. Teste de Student après ANOVA.

**1- Effet dose réponse de la cotinine dans le striatum et sa désensibilisation** Dans un premier temps, nous avons reproduit les effets dose réponse de la cotinine sur la libération de DA dans le striatum (Fig. 29).

L'effet de la cotinine sur la libération de DA dans le striatum se situe dans l'intervalle de concentrations [0,1-10] nM. Au-delà de 10 nM, la réponse désensibilise rapidement et aucune différence avec le contrôle n'est observée dès 50 nM (Fig. 29).



## LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LA LIBÉRATION DES NEUROMÉDIATEURS



**Figure 29.** Effet dose réponse de la cotinine sur la libération de la DA dans les synaptoomes du striatum chez le rat. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  écart à la moyenne du pic de libération, calculé en % de la ligne de base et normalisé. Les chiffres gras représentent le nombre de canaux testés par concentration de cotinine ou de tampon de perfusion seul comme contrôle. Étoiles,  $P \leq 0,01$  par rapport au contrôle. Test de Student après ANOVA.

**2- Potentialisation des effets de la cotinine nM sur la libération de DA par les antagonistes des nAChRs.** La pharmacologie de cette réponse a été caractérisée avec la mécamylamine et la méthyllycaconitine, deux antagonistes des nAChRs. L'analyse de variance globale (toutes concentrations confondues ;  $F_{4,163} = 21,24$  ;  $P \leq 4.10^{-14}$ ) ou par concentration ( $F_{17,150} = 4,68$  ;  $P \leq 7.10^{-8}$ ) montre l'existence de différences très significatives entre les traitements. La comparaison des moyennes montre :

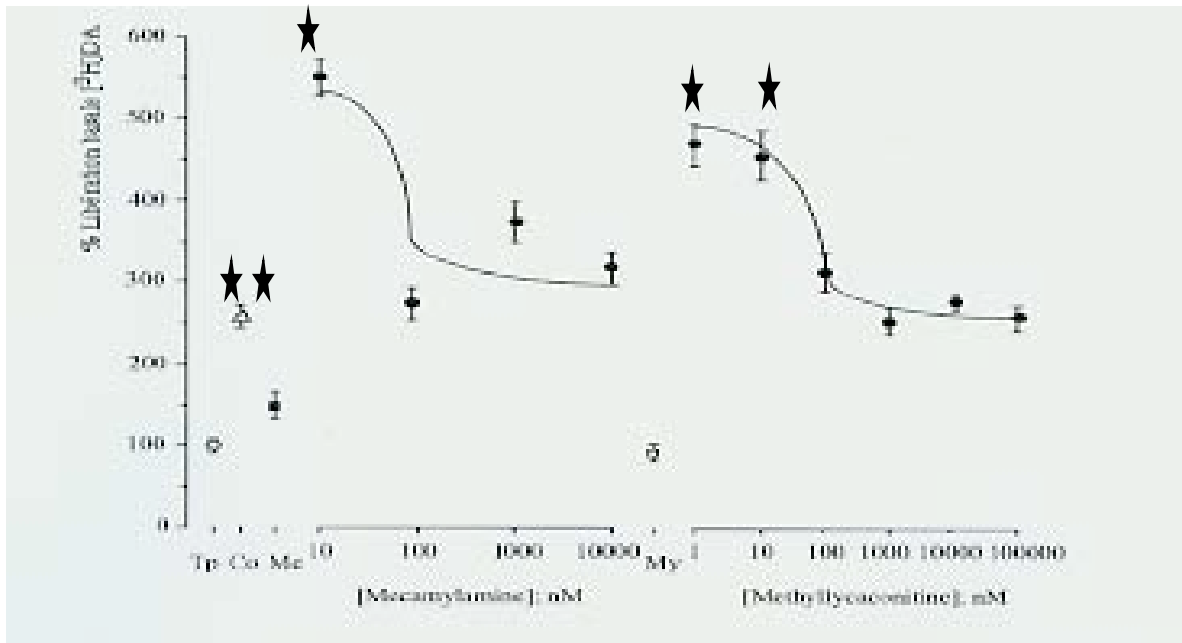
- 1- Que l'administration des antagonistes des nAChRs n'a pas d'effet significatif sur la libération basale de DA (méthyllycaconitine 10  $\mu\text{M}$ ,  $t = 0,07$ ,  $P$  non significatif ; mécamylamine 10  $\mu\text{M}$ ,  $t = 0,17$ ,  $P$  non significatif) (Fig. 30).

## **LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LA LIBÉRATION DES NEUROMÉDIATEURS**

- 2- Que la libération basale de DA est stimulée significativement par la cotinine 10 nM ( $t = 2,65, P \leq 0,05$ ) (Fig. 30).
- 3- Que la libération de DA provoquée par la cotinine 10 nM est stimulée significativement en présence des faibles concentrations de methyllycaconitine (1 nM,  $t = 2,62, P \leq 0,05$  et 10 nM,  $t = 2,36, P \leq 0,05$ ) ou de mécamylamine (10 nM,  $t = 3,08, P \leq 0,05$ ).
- 4- Que la libération de DA provoquée par la cotinine 10 nM n'est pas inhibée en présence des fortes concentrations de methyllycaconitine (10  $\mu\text{M}$ ,  $t = 0,34, P$  non significatif et 100  $\mu\text{M}$ ,  $t = 0,1, P$  non significatif) ou de mécamylamine (0,1-10  $\mu\text{M}$ ,  $t = 0,05-0,74, P$  non significatif).

Ces résultats montrent que la libération de DA provoquée par la cotinine 10 nM est potentialisée, significativement, par les faibles concentrations des antagonistes des nAChRs. Cette potentialisation désensibilise aux fortes concentrations des antagonistes. Les antagonistes n'ont aucun effet inhibiteur sur la libération de DA provoquée par la cotinine (Fig. 30).

## LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LA LIBÉRATION DES NEUROMÉDIATEURS

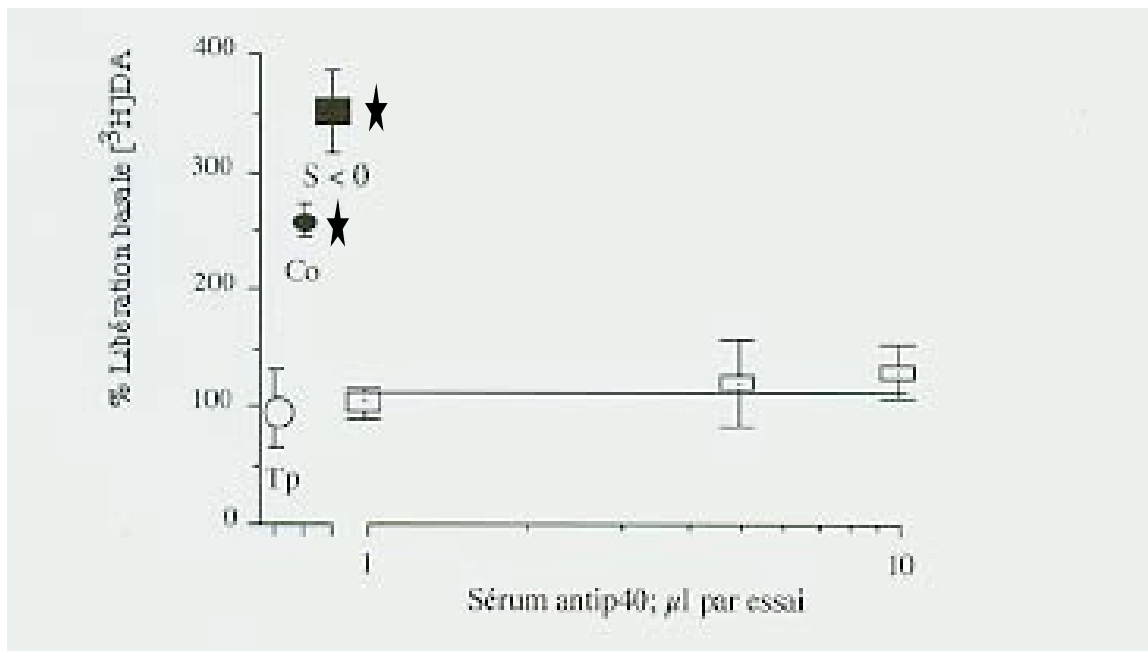


**Figure 30.** Blocage avec les antagonistes des nAChRs de la libération de DA des synaptosomes du striatum provoquée par la cotinine. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  écart à la moyenne du pic de libération, calculé en % de la ligne de base et normalisé (n = 6-10 méthyllycaconitine ; n = 4-7 mécamylamine). L'effet de l'administration du tampon comme contrôle (Tp, rond vide), méthyllycaconitine  $10^{-6}$  M (Fig. de droite My, carré vide), mécamylamine  $10^{-5}$  M (Fig. de gauche Me, carré vide) et cotinine  $10^{-8}$  M (Co, triangle vide) seuls est montré. 2Étoile,  $P \leq 0,05$  par rapport au contrôle ; Étoiles,  $P \leq 0,05$  par rapport à cotinine seule. Teste de Student après ANOVA.

**3- Rôle des récepteurs de la cotinine (p40) dans la libération de DA provoquée par la cotinine nM.** La contribution des récepteurs de la cotinine (p40) à cette réponse a été évaluée par les anticorps dirigés contre les récepteurs de la cotinine, isolés par chromatographie d'affinité (antip40). La comparaison des moyennes montre (Fig. 31) :

## LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LA LIBÉRATION DES NEUROMÉDIATEURS

- 1- Que le sérum témoin n'a aucun effet ( $t = 1,15$ ,  $p$  non significatif) sur la libération de DA provoquée par la cotinine.
- 2- Que le sérum antip40 inhibe totalement et dès  $1 \mu\text{l}$  par essai la libération de DA provoquée par la cotinine.
- 3- Que le sérum antip40 de  $1$  à  $10 \mu\text{l}$  n'a aucun effet sur la libération basale de DA (Fig. 31).



**Figure 31.** Blocage total avec les antip40 de la libération de DA des synaptosomes du striatum provoquée par la cotinine  $10 \text{ nM}$ . Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  écart à la moyenne du pic de libération, calculé en % de la ligne de base et normalisé (contrôle  $n = 7$  ; cotinine avec antip40  $n = 13-18$ , avec sérum témoin  $n = 35$ ). L'effet de l'administration du contrôle (Tp, rond vide), cotinine  $10^{-8} \text{ M}$  (Co, rond plein) et sérum témoin ( $S < 0$ , carré plein) est montré. Étoile,  $P \leq 0,05$  par rapport au contrôle et par rapport au sérum antip40. Test de Student après ANOVA.

# LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LA LIBÉRATION DES NEUROMÉDIATEURS

## DISCUSSION

L'étude présente montre que la cotinine module la libération des neuromédiateurs DA et NA des synaptosomes du cerveau du rat d'une manière dépendante de la concentration, la région et le neuromédiateur. Suivant le neuromédiateur et la région cérébrale considérés, les résultats montrent un comportement opposé (Fig. 27) entre :

- a- Le cervelet et les autres régions.
- b- La DA et la NA.
- c- La libération et la capture.

En tenant compte des données clés suivantes de la littérature :

- 1- Ce protocole expérimental n'est pas adapté pour la mesure de la capture (Clarke and Reuben, 1996).
- 2- La cotinine, aux concentrations supérieures au  $\mu\text{M}$ , stimule *in vitro* la libération de la DA via des nAChRs (Dwoskin et al., 1999).
- 3- Elle inhibe *in vivo* la capture et l'accumulation de la 5-hydroxytryptamine (5-HT). L'effet n'est pas bloqué par la mécamylamine et via des récepteurs non cholinergiques non 5-HT (Fuxe et al., 1979).
- 4- Le pré-traitement par la cotinine inhibe les effets stimulateurs de l'administration de la nicotine et de la cocaïne sur la libération de DA dans le striatum chez le rat étudié par micro dialyse (Sziraki et al., 1999).
- 5- La mécamylamine augmente l'index thérapeutique de la nicotine (Rose et al., 1994; Rose et al., 1998) sans effet inhibiteur sur la synapse cholinergique (Rose et al., 2001).
- 6- La mécamylamine est effective dans la réduction de la compulsion pour la cocaïne (Reid et al., 1999).

## LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LA LIBÉRATION DES NEUROMÉDIATEURS

- 7- La mécamylamine est effective dans le traitement de certains désordres psychiatriques (Silver et al., 2000).
- 8- Le récepteur p40 de la cotinine a été isolé (Riah et al., 2000).
- 9- La cotinine endogène et la p40 interviennent dans les mécanismes du stress.
- 10- La cotinine et la p40 sont impliquées dans l'activité anti-stress de la nicotine.

Nous avons émis les hypothèses que la cotinine module la libération des neuromédiateurs, comme le montre l'exemple de la NA et de la DA (Fig. 27) via :

**H1** : Le récepteur p40 est responsable des effets modulateurs de la cotinine sur la libération de NA et de DA dans l'intervalle de concentration nM à  $\mu$ M.

**H2** : Le nAChRs est responsable des effets modulateurs de la cotinine sur la libération de NA et de DA dans l'intervalle de concentration  $\mu$ M à mM.

**H3** : L'existence d'interactions entre la nicotine, la cotinine et les antagonistes des nAChRs.

L'hypothèse **H3** a été évaluée par l'étude avec les antagonistes nicotiques. Les résultats ont confirmé que les antagonistes des nAChRs potentialisent les effets de la cotinine sur la libération des neuromédiateurs (Fig. 28-29). La mécamylamine dans l'intervalle de concentration [nM,  $\mu$ M] a potentialisé l'effet de la cotinine  $\mu$ M sur la libération de DA, cependant l'effet s'était seulement rapproché de la signification ( $P \leq 0,057$ ) (Fig. 28). Nous avons revalorisé cette hypothèse avec deux antagonistes des nAChRs et baissé la concentration de la cotinine à 10 nM pour étudier les interactions sur la libération de DA dans le striatum (Fig. 30). Les résultats obtenus ont confirmé une potentialisation significative des effets de la cotinine nM sur la libération de DA (Fig. 30). La potentialisation des effets de la cotinine par les antagonistes des nAChRs a été observée, auparavant lors de l'étude toxicologique où l'hexamethonium, un autre antagoniste des nAChRs périphériques, a potentialisé la toxicité de la cotinine (Riah et al., 1999). Il était donc intéressant de généraliser ce mécanisme de potentialisation avec des antagonistes des nAChRs centraux. Le mécanisme

## **LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LA LIBÉRATION DES NEUROMÉDIATEURS**

intime de cette potentialisation semble faire intervenir des modifications de la liaison de la cotinine sur ses récepteurs. Clairement, les ligands agonistes et antagonistes nicotiques seraient des stimulateurs de sa liaison. Dans ce dernier cas, leur effet ferait intervenir un site allostérique positif donc non compétitif. En faveur de ces hypothèses, nous avons montré une augmentation du transport de la cotinine dans le cerveau en présence de nicotine et une inhibition de son transport en présence d'hexaméthonium (Chapitre III). Également, nous avons montré une inhibition des effets de l'administration de la cotinine sur ses récepteurs  $\alpha 4\beta 2$  en présence de nicotine (Chapitre III). Ces résultats supportent les effets thérapeutiques bénéfiques des mélanges de la nicotine et de la mécamylamine (Rose et al., 1994; Rose et al., 1998). Ils supportent également les effets favorables de la mécamylamine sur la compulsion pour la cocaïne (Reid et al., 1999) et les désordres psychiatriques (Silver et al., 2000). Plus encore, les effets bénéfiques de la mécamylamine ne seraient pas liés à un blocage de la synapse cholinergique (Rose et al., 2001). Enfin, pour concilier les effets des antagonistes des nAChRs sur la libération de DA (Fig. 28-29) et les effets bénéfiques de la mécamylamine dans la réduction de la compulsion pour la cocaïne (Reid et al., 1999) et thérapeutiques en général (Silver et al., 2000) (en absence d'administration de nicotine), nous avons proposé la mobilisation de la cotinine endogène (Chapitre III).

Ces interactions (bénéfiques) peuvent faire intervenir l'existence de sites allostériques coopératifs positifs sur la  $\alpha 4\beta 2$  capable de lier les antagonistes des nAChRs et d'amplifier l'effet de la cotinine. Dans ce cas, l'absence de potentialisation aux fortes concentrations des antagonistes résulterait d'une inhibition de la liaison de la cotinine ou d'une désensibilisation des sites allostériques coopératifs positifs et / ou de la réponse. En faveur de ces hypothèses, nous avons montré une multiplicité des sites récepteurs de la cotinine et des effets coopératifs sur la  $\alpha 4\beta 2$  ont été suggérés par la détermination d'un  $n_{Hill} \geq 2$ , un Scatchard curviligne ainsi

## LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LA LIBÉRATION DES NEUROMÉDIATEURS

que les données d'inhibition (Riah et al., 2000). De plus, la mécamylamine inhibe la liaison sur la p40 avec une affinité  $IC_{50} \leq \mu M$ . Enfin, la libération de la dopamine désensibilise lors de l'augmentation de la concentration de la cotinine (Fig. 29). Aux fortes concentrations, les antagonistes peuvent inhiber l'interaction de la cotinine avec ses récepteurs (p40). Cependant, la fait que nous obtenons une désensibilisation de la potentialisation, dès les concentrations 100 nM avec les deux antagonistes, sans inhibition de l'effet propre de la cotinine rend cette hypothèse peut probable. Enfin, une dernière hypothèse serait que les antagonistes inhibent la capture de la DA et favorisent, par conséquent sa libération. Cette hypothèse semble peu plausible car d'une part, l'effet rajouté serait de + 40 %. Cette valeur maximale a été estimée pour la capture de la DA dans le cervelet dans ce schéma expérimental (Fig. 27), or l'effet rajouté de la potentialisation est de 100 % (Fig. 30). D'autre part, ce mécanisme n'expliquerait pas l'absence de potentialisation aux fortes concentrations des antagonistes. Ces considérations favorisent donc, en accord avec nos travaux antérieurs (Riah et al., 1999; Riah et al., 2000), l'hypothèse de la présence de sites allostériques coopératifs positifs sur les récepteurs de la cotinine (p40) et sujet à la désensibilisation.

L'interaction de la cotinine avec les nAChRs ou hypothèse **H2** a été rapportée dans d'autres travaux ; qui ont montré que la cotinine stimule la libération de DA dans le striatum avec un  $EC_{50}$  de 30  $\mu M$  par un mécanisme  $Ca^{2+}$  dépendant et bloqué par la mécamylamine (Dwoskin et al., 1999). Cependant, les sous-types de nAChRs impliqués dans la libération de la DA et de la NA ont une pharmacologie différente et leur composition exacte en sous-unité reste à déterminer (Clarke and Reuben, 1996). Il serait donc souhaitable d'évaluer en parallèle les effets de la nicotine et de la cotinine sur la libération de ces neuromédiateurs.



# **LA COTININE ET SES RÉCEPTEURS DANS LA LIBÉRATION DES NEUROMÉDIATEURS**

L'hypothèse ***H1*** a été démontrée par les résultats obtenus dans l'étude présente (Fig. 31). En effet, la libération de la DA dans le striatum par la cotinine 10 nM a été bloquée par les anticorps dirigés contre les récepteurs de la cotinine (p40). Ces résultats démontrent pour la première fois, à l'échelle des protéines réceptrices de la cotinine, la possibilité de modulation de la libération de la dopamine, le neurotransmetteur clé dans la récompense. En faveur de nos résultats, un pré-traitement par la cotinine (0,5 mg.kg<sup>-1</sup>) a été rapporté capable d'inhiber les effets stimulateurs de l'administration de la nicotine et de la cocaïne sur la libération de dopamine (Sziraki et al., 1999). En faveur également de ces résultats, le traitement à la cotinine est capable de down réguler son récepteur de haute affinité (p40) avec un EC<sub>50</sub> inférieur à 0,5 mg.kg<sup>-1</sup> (Chapitre III).

En résumé, ces résultats constituent une suite de nos travaux antérieurs sur le rôle de la cotinine et de la p40 dans la récompense (Chapitre III) et nécessaire pour comprendre le rôle du système cotinine-p40 dans la peroxydation lipidique (Chapitre V-C ; Riah et al., 2002). En accord avec les interactions de la dopamine et le stress (Piazza and Le Moal, 1996; Soto-Otero et al., 2002) et son rôle spécifique dans la récompense (Robinson and Berridge, 1993; Uhl et al., 1996) et dans les maladies de la dégénération neuronale (Riobo et al., 2002), ces résultats suggèrent un rôle très important pour le système cotinine-p40 dans les processus physiologiques et / ou physiopathologiques et du métabolite de la nicotine, la cotinine (endogènes et / ou exogènes) dans le renforcement de l'attitude addiction.

**MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA  
NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON**

**CHAPITRE V. MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION  
ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS  
L'EAU DE BOISSON**

**A- CROSS TALK ENTRE LES MECANISMES DE LA RECOMPENSE DE LA NICOTINE ET DE LA  
COTININE CHEZ LA SOURIS**

# MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON

**ABSTRACT** Drinking behavior is sustained by the activity of the reward system. The present study was conducted to evaluate effects of the administration in drinking water of nicotine, cotinine or their mixture on drinking behavior in mice. The alkaloids were made fresh in water solution in the evening and volumes of solution consumed in a set of three experiments were compared to those of water-control groups. When drugs were presented as the only source of drinking for 14 days, nicotine (1N to 4N) produced hypodipsia, cotinine (10C to 40C) was inactive, but its presence potentiated nicotine effects. Then animals were shifted to choose between water and drug (two sources), with daily exchange of place of water and drug solution for 18 days. The analysis of consumption in the habitual (CHab) and novel (CNov) context showed no reduction of overall water intake, nicotine aversion and cotinine reinforcement in the CHab and aversion in the CNov. Nicotine aversion did not desensitize, while both effects of cotinine did. After this period, nicotine-treated groups were shifted to choose between water and cotinine 10C and cotinine-treated groups to choose between water and nicotine 1N for two days with drug presented in the CNov. Results showed that cotinine reinforcement was sensitized dose-dependent, while nicotine aversion was inhibited dose-dependent. In another set of experiments, groups of mice were administered overnight nicotine (1N) or cotinine (0,01C or 0,1 C) followed by one-week withdrawal (water *ad libitum*) and again overnight administration of 5-fold higher doses (x5). Animals were then allowed to choose between water, nicotine or cotinine, each one in a bottle (three sources), with periodical dilution of drug by 3 each 14-18 days, starting in period one (P1) from the same dose (namely, N=C) to reach P4 (initial dose divide by 27). Results showed no reduction of overall water intake, nicotine aversion in all three groups, while cotinine aversion was not present in the 0,01Cx5 group and potentiated at P2 in the 0,1Cx5 group. These results show that alkaloids affect differently reward, as a flexible approach toward fitness benefits, in agreement with their relative toxicity. Cotinine effects should be mediated through receptors prompt to desensitization within the nucleus-accumbens dopamine system, while those of nicotine through robust receptors within other dopamine systems like the nigro-striatal continuum. Finally, these systems should be structured for fitness benefits, negative reward system upstream positive reward one.

**Key words** Nicotine and cotinine ; drinking behavior ; context and reward ; aversion and reinforcement ; dopamine pharmacology ; mice.

## A- CROSS TALK ENTRE LES MECANISMES DE LA RECOMPENSE DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE CHEZ LA SOURIS

# **MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA**

## **NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON**

**RÉSUMÉ** Le comportement d'abreuvement est soutenu par l'activation du système de la récompense. L'étude présente a été conduite pour évaluer l'effet de l'administration dans l'eau de boisson de la nicotine et de la cotinine sur le comportement d'abreuvement chez la souris. Les alcaloïdes ont été mis en solution fraîche tous les soirs dans l'eau de boisson et les volumes consommés dans trois séries d'expériences ont été comparés à ceux des groupes contrôles eau. Lorsque les alcaloïdes ont été présentés comme source unique de boisson pendant 14 jours, la nicotine (1N à 4N) a produit une hypodipsia, la cotinine (10C à 40C) était inactive, mais sa présence a potentialisé les effets de la nicotine. Les animaux ont ensuite été shiftés pour choisir entre l'alcaloïde et l'eau (deux sources) avec inversion quotidienne des positions de l'eau et de l'alcaloïde pendant 18 jours. L'analyse des consommations dans le contexte habituel (CHab) et nouveau (CNov) a montré une absence de réduction du volume total des solutions, l'aversion de la nicotine et le renforcement de la cotinine dans le CHab et son aversion dans le CNov. L'effet aversif de la nicotine ne désensibilise pas, alors que les deux effets de la cotinine désensibilisent. Après cette période, les groupes prétraités à la nicotine ont été shiftés pour choisir entre l'eau et une seule dose de cotinine (10C) et les groupes prétraités à la cotinine une seule dose de nicotine (1N) pendant deux jours et les alcaloïdes présentés dans le CNov. Les résultats montrent que le renforcement de la cotinine est sensibilisé de manière dose dépendante, alors l'aversion de la nicotine est inhibée de manière dose dépendante. Dans une autre série d'expériences, des groupes de souris ont été administrés une nuit la nicotine (1N) ou la cotinine (0,01C ou 0,1 C), suivie d'une semaine de retrait (eau *ad libitum*) puis une nuit d'administration de doses 5 fois supérieures (x5). Les animaux devaient ensuite choisir entre l'eau, la nicotine ou la cotinine chacun dans son biberon (trois biberons) avec une dilution périodique des alcaloïdes par 3 tous les 14-18 jours, en partant de la période 1 (P1) de la même concentration (soit N=C) jusqu'à atteindre la période P4 (dose initiale divisée par 27). Les résultats ont montré une absence de réduction du volume total de solution, l'aversion de la nicotine dans les trois groupes, alors que l'aversion de la cotinine n'était pas présente dans le groupe 0,01Cx5 et a été potentialisée à P2 dans le groupe 0,1Cx5. Ces résultats montrent que les alcaloïdes affectent différemment la récompense, une approche

### **A- CROSS TALK ENTRE LES MECANISMES DE LA RECOMPENSE DE LA NICOTINE ET DE LA**

#### **COTININE CHEZ LA SOURIS**

# **MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON**

flexible vers la performance vitale, en accord avec leur toxicité relative. Les effets de la cotinine seraient médiés par des récepteurs prompts à la désensibilisation au sein du système dopaminergique du nucleus accumbens, alors que ceux de la nicotine par des récepteurs robustes au sein d'autres systèmes dopaminergiques comme le nigro striatal continuum. Enfin, ces systèmes seraient structurés pour la performance vitale, ceux des renforcements négatifs en amont de ceux des renforcements positifs.

**Mots clés** Nicotine et cotinine ; Comportement ; Boire ; Contexte et récompense ; Renforcement positif et négatif ; Dopamine ; Nucleus accumbens ; Nigro striatal continuum ; Souris.

# **MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON**

## **INTRODUCTION**

L'administration de la nicotine par différentes voies chez l'animal est utile dans la recherche des mécanismes de la dépendance et le criblage des activités proposées dans l'aide au sevrage tabagique. Ces modèles sont peu nombreux (Pietila and Ahtee, 2000) et le plus souvent la nicotine a été administrée par voie parentérale en injection sous-cutanée (SC) ou intra-péritoiné (IP) (Clarke, 1987). Une voie parentérale récente consiste à implanter SC des mini-pompes osmotiques ou réservoirs qui délivrent la nicotine chez le rat ou la souris (Murrin et al., 1987). L'administration de la fumée de tabac (Wager-Srdar et al., 1984) permet surtout d'évaluer les effets du tabagisme passif. La nicotine a aussi été administrée par voie orale dans l'eau de boisson ou dans un nutriment liquide (Murrin et al., 1987). Par voie orale, la nicotine a été administrée par force ou dans un schéma expérimental induisant la polydipsie, c'est-à-dire un contrôle sur le poids de l'animal vers la baisse qui permet d'associer la nourriture à l'augmentation de la quantité d'eau ingérée (Lang et al., 1977).

Le plus souvent, la nicotine a été présentée *ad libitum* dans l'eau de boisson (Naquira and Arqueros, 1978; Rowell et al., 1983; Kita et al., 1985; Yamanaka et al., 1985; Murrin et al., 1987; Yamanaka et al., 1987; Qiu et al., 1992; Pietila et al., 1995; Wong and Ogle, 1995; Pietila et al., 1996; Pietila et al., 1998; Gaddnas et al., 2000; Pietila and Ahtee, 2000; Eliakim et al., 2002). Dans ces conditions, les animaux réduisent leur consommation de solution c'est-à-dire que la nicotine produit une hypodipsia qui a été expliquée par une aversion liée à son goût désagréable (Taste Aversion TA) (Naquira and Arqueros, 1978; Murrin et al., 1987; Le Houezec et al., 1989) ou à ses effets antidiurétiques (Mansner and Mattila, 1975). Cependant, même par injection parentérale la nicotine produit comme le chlorure de lithium, une aversion à la saccharine (Etscorn et al., 1986). De plus, l'intensité des effets aversifs de la nicotine a été corrélée à l'intensité de son effet toxique de crise (Robinson et al., 1996). L'acidité gastro-intestinale peut aussi réduire son absorption et favoriser sa dégradation, limitant ainsi ses actions psychopharmacologiques (Balfour, 1980; Le Houezec et al., 1989). Dans l'eau de boisson, l'augmentation graduelle des doses de nicotine a montré que son administration dans l'eau de boisson affecte le

## **A- CROSS TALK ENTRE LES MECANISMES DE LA RECOMPENSE DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE CHEZ LA SOURIS**

# **MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON**

métabolisme de la dopamine, permet son transport dans le cerveau (Pietila et al., 1995), induit la tolérance (Pietila et al., 1996), module ses récepteurs et ses effets sur la motricité (Pietila et al., 1998). C'est donc un modèle valable pour étudier les effets de la nicotine (Gaddnas et al., 2000; Pietila and Ahtee, 2000). Cependant, à l'exception de son administration dans un nutriment liquide (Halladay et al., 1999), la nicotine *ad libitum* produit une hypodipsia (Naquira and Arqueros, 1978; Rowell et al., 1983; Kita et al., 1985; Yamanaka et al., 1985; Murrin et al., 1987; Yamanaka et al., 1987; Qiu et al., 1992; Pietila et al., 1995; Wong and Ogle, 1995; Pietila et al., 1996; Pietila et al., 1998; Gaddnas et al., 2000; Pietila and Ahtee, 2000; Eliakim et al., 2002). L'origine de l'hypodipsia de la nicotine a été interprétée dans la présente étude à la lumière des concepts actuels et des effets de son principal dérivé, la cotinine.

## **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

Les effets de l'administration de la nicotine et de la cotinine ont été étudiés chez la souris *Mus musculus* naive à tout traitement avant l'expérimentation. Les animaux avaient un accès *ad libitum* à la nourriture standard commercial (Rat A04) et au biberon d'eau. Les protocoles expérimentaux, impliquant les animaux, étaient en accord avec les directives du *Guide de la Protection et de l'Usage des Animaux de Laboratoire*. Ils ont été approuvés par le Comité Usage et Protection des Animaux de Laboratoire de l'Université Paul Sabatier. Les alcaloïdes ont été mis en solution fraîche tous les soirs dans l'eau de boisson et présentés *ad libitum* comme seule source d'eau (imposé) ou en parallèle avec une source d'eau (choix double) pendant 14 jours, puis présentés pendant 18 jours avec inversion de la position de la solution de l'alcaloïde et de l'eau tous les soirs (contexte habituel et nouveau). Enfin, pendant 2 jours, les doses de nicotine ont été remplacées par une seule dose de cotinine et vice-versa (substitution) dans le contexte nouveau. D'autres groupes ont dû choisir directement entre l'eau, la cotinine et la nicotine (trois sources) de plus, les alcaloïdes ont été dilués progressivement (choix multiple). Dans tous les cas, des groupes eau contrôles imposé, double et multiple ont été inclus. La consommation des solutions a été

## **A- CROSS TALK ENTRE LES MECANISMES DE LA RECOMPENSE DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE CHEZ LA SOURIS**

# MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON

mesurée avec des éprouvettes équipées d'une tétine, le volume total a été obtenu par addition des volumes sur chaque position. Celui-ci a été calculé en proportion (ou en %) du volume total.

Les données ont été analysées suivant les cas par le test de l'hypothèse nulle et/ou l'analyse de variance (ANOVA). La normalité a été estimée par le test E/S de David et l'égalité des variances par le test  $S_{i_{\max}}^2/\Sigma (S_i^2)$  de Cochran. Les comparaisons ont été faites par le test de Scheffé.

## **RÉSULTATS**

### **A- 1- Considérations méthodologiques**

Les animaux ont consommé les solutions de nicotine (N, 2N et 4N), de cotinine (10C, 20C et 40C) ou les mélanges des deux alcaloïdes (N + 10C; 2N + 10C; 4N + 10C et 4N + 40C) comme seule source de boisson pendant 14 jours. Durant cette période est appelée pré-test ou de conditionnement. L'analyse de variance à deux voies sans réplication (bloc : Jour x Traitement) montre un effet très significatif du traitement ( $F_{10,130} = 36 ; P \leq 9.10^{-33}$ ) et des jours ( $F_{13,130} = 25 ; P \leq 2,9.10^{-29}$ ) avec une périodicité de 2-3 jours sur la consommation. Les animaux ont eu ensuite le choix entre la consommation d'eau et la solution d'alcaloïde (deux biberons par groupe). De plus, la position des deux biberons est inversée quotidiennement. Durant cette période, appelée test, une analyse de variance identique sur les volumes additionnés des deux biberons montre un effet très significatif du traitement ( $F_{10,160} = 22,97 ; p = 3.10^{-26}$ ) et une accentuation de l'effet jour ( $F_{16,160} = 69,46 ; P \leq 3.10^{-63}$ ) avec une période de 2-3 jours (Fig. 32). Enfin, les doses de nicotine ont été remplacées par une seule dose de cotinine et vice-versa pendant deux jours appelés période de substitution (Fig. 32).

La périodicité observée peut avoir les origines suivantes :

**A- 1- a- Artefact.** Lié au changement de la litière, variation de l'hygrométrie ou autre. Cependant,

## **A- CROSS TALK ENTRE LES MECANISMES DE LA RECOMPENSE DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE CHEZ LA SOURIS**



# MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON

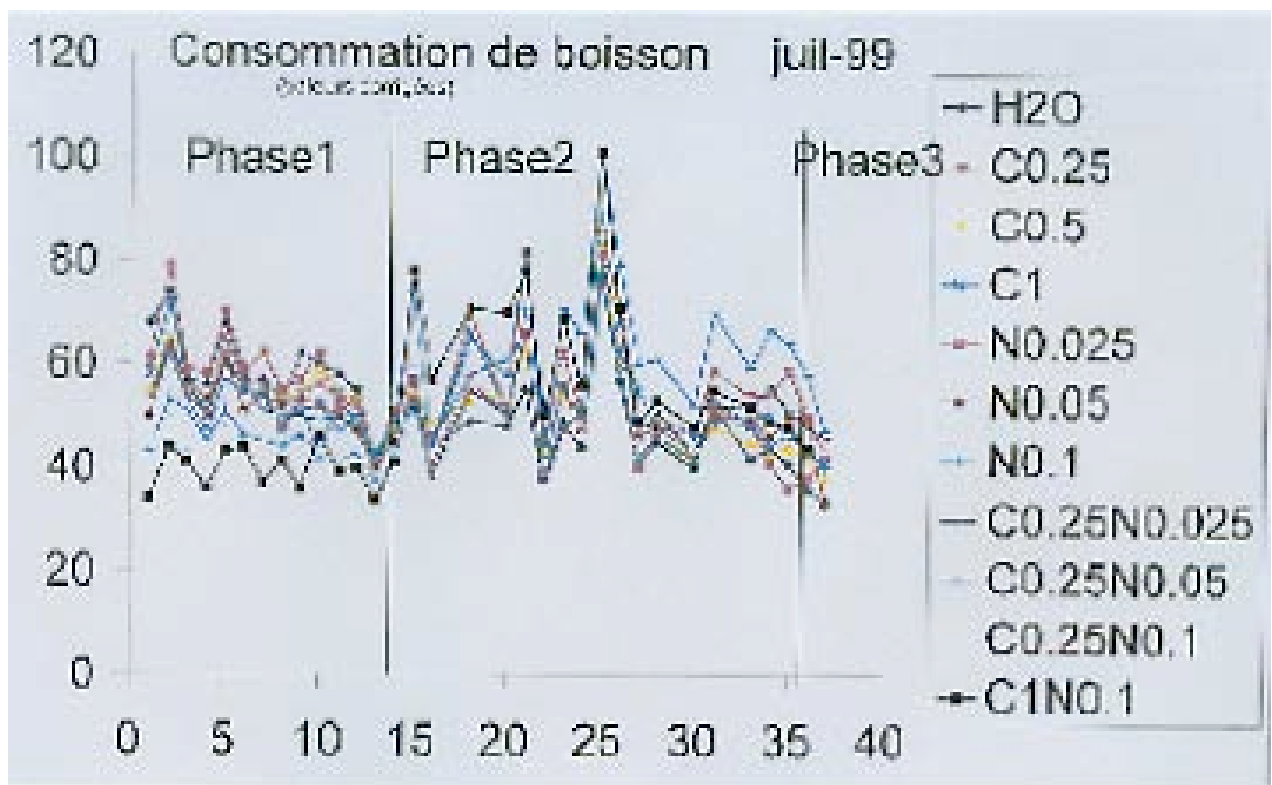
l'animalerie est aux normes, de plus on ne la retrouve pas pour tous les groupes et elle a été accentuée lors du test.

**A- 1- b- Physiologie.** Liée aux inductions et adaptations des systèmes de détoxication et des récepteurs.

**A- 1- c- Apprentissage.** Nous avons comparé la consommation d'eau de deux groupes de 10 animaux. Le premier a eu un accès direct à deux biberons d'eau. Le deuxième groupe a eu un pré-test de 4 sessions (nuits) avec changement de la position du biberon eau entre les deux positions avant d'accéder à deux biberon d'eau. Nous avons appliqué le test de l'hypothèse nulle ( $\delta = 0$ ) pour comparer la différence moyenne ( $D_m$ ) de la consommation d'eau sur les deux positions pendant 14 jours. Les résultats montrent que le groupe qui a eu le pré-test consomme sur les deux positions de manière équivalente, sa  $D_m = 0,07$  est proche de 0 ( $P \leq 20\%$ ), alors que le groupe qui a accédé directement à deux sources d'eau continue de consommer davantage sur le biberon en position habituelle, sa  $D_m = 0,26$  est moins proche de 0 ( $P \leq 80\%$ ). Ce résultat montre que l'apprentissage améliore la performance des animaux pour consommer sur les deux position.

# MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA

## NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON



**Figure 32. Évolution du volume total des solutions (en ml) consommés par groupe de 10 souris au cours (en jours) du pré-test (phase I), du test (phase II) et du test de substitution (phase III).** La nicotine, la cotinine et leurs mélanges ont été administrés dans l'eau de boisson *ad libitum* chez la souris comme seule source d'eau 14 jours (phase I), puis avec la possibilité de choisir entre l'eau et l'alcaloïde (Phase II) et enfin les doses de nicotine ont été substituées par une seule dose de cotinine et vice-versa (Phase III). Pendant la phase II, nous avons inversé quotidiennement la position de l'eau et de l'alcaloïde de manière à créer un contexte de nouveauté.

Remarquez la périodicité en phase I et son accentuation en phase II.

Abréviations, N (nicotine) = C (cotinine) en mg/ml.

**Conclusion 1** Nous retiendrons que la consommation de solution peut-être affectée par les alcaloïdes et l'apprentissage.

### A- CROSS TALK ENTRE LES MECANISMES DE LA RECOMPENSE DE LA NICOTINE ET DE LA

#### COTININE CHEZ LA SOURIS

# MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON

## **A- 2- Consommation des solutions**

**A- 2- a- La nicotine peut stimuler la consommation des solutions.** La nicotine inhibe sa consommation dans le pré-test, elle est donc aversive (Fig. 33 haut). Au contraire, elle stimule la consommation totale dans le test, elle ne produit donc pas d'hypodipsia (Fig. 33 bas).

**A- 2- b- La cotinine n'a pas d'effet sur la consommation des solutions.** La cotinine à des concentrations 10 fois supérieures à celles de la nicotine n'a pas d'effet significatif sur la consommation de solutions dans le pré-test et le test (Fig. 33).

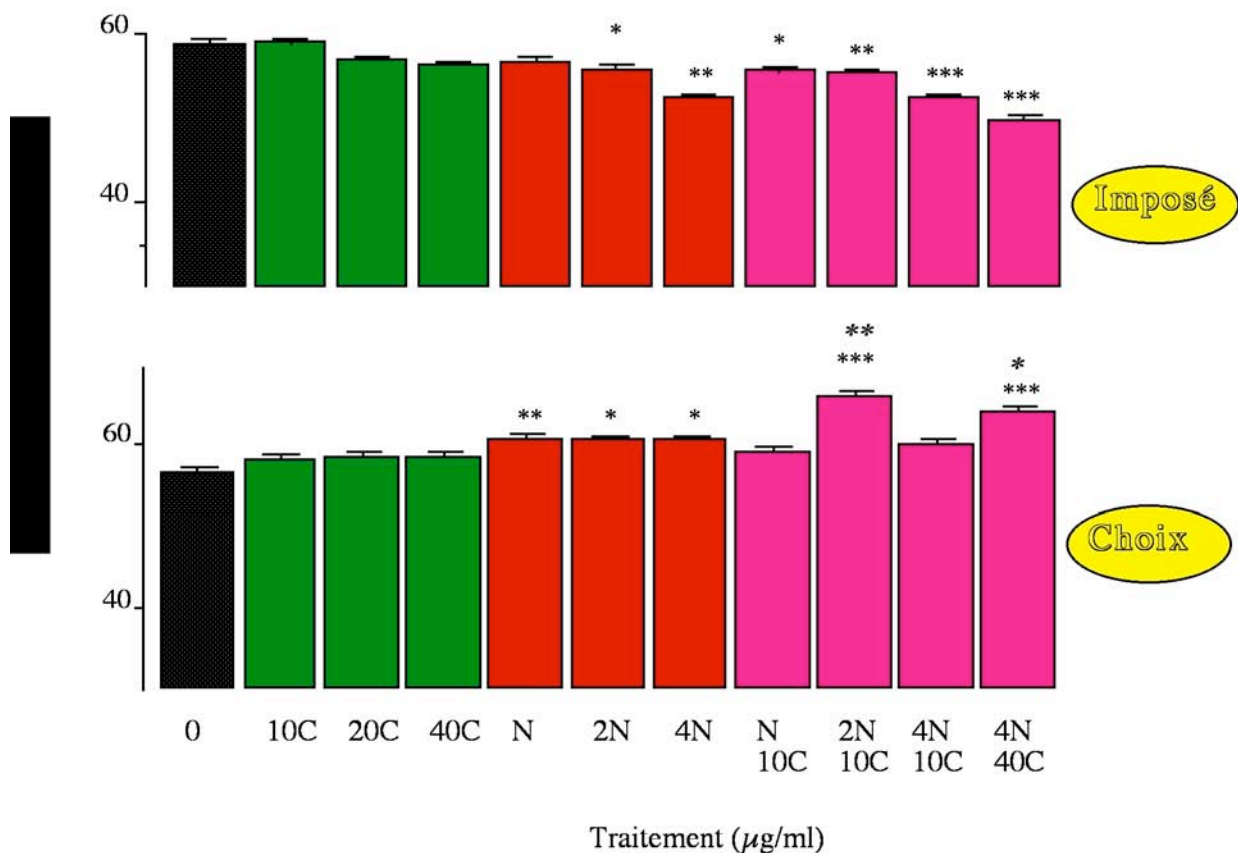
**A- 2- c- La cotinine module les effets de la nicotine sur la consommation des solutions.** La présence de cotinine renforce visiblement les effets aversifs de la nicotine dans le pré-test (Fig. 33 haut) et significativement les effets stimulateurs de la nicotine sur la consommation dans le test (Fig. 33 bas). Certains mélanges sont virtuellement inactifs (Fig. 33 bas). Dans les mélanges, l'augmentation de la concentration de l'un des deux alcaloïdes produit un effet linéaire dans le pré-test (Fig. 33 haut) et non linéaire dans le test (Fig. 33 bas).

**Conclusion 2** Nous retiendrons que la disparition de l'effet inhibiteur de la nicotine sur la consommation en phase II indique que son hypodipsia en phase I ne serait pas lié à son activité antidiurétique. L'absence d'effet de la cotinine en phase I et II ne permet pas d'exclure qu'elle est active, puisque sa présence renforce les effets de la nicotine de manière linéaire en phase I et de manière non linéaire en phase II.

## **A- CROSS TALK ENTRE LES MECANISMES DE LA RECOMPENSE DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE CHEZ LA SOURIS**

# MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA

## NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON



\*, \*\*, et \*\*\*, significativement différent du contrôle à 5%, 1% et très significatif.

\*\*, 1%; \*, 5% par rapport à nicotine seule. Scheffé.

**Figure 33. Absence d'effet hypodipsia de la nicotine chez la souris et potentialisation des effets de la nicotine par la cotinine.**

Les souris ont été traitées comme décrit dans la légende de la Figure 32. Les valeurs, mL/groupe de 10 individus, représentent la moyenne  $\pm$  SEM (erreur à la moyenne).

Remarquez l'inhibition significative de la consommation par la nicotine en phase I (imposé) et la stimulation de la consommation totale en phase II (choix).

Remarquez la potentialisation significative des effets de la nicotine par la cotinine.

Remarquez l'effet dose dépendant pour les mélanges en phase I et son absence en phase II.

### A- CROSS TALK ENTRE LES MECANISMES DE LA RECOMPENSE DE LA NICOTINE ET DE LA

#### COTININE CHEZ LA SOURIS

# MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON

## A- 3- La consommation de solution est-elle un test de type CPP (conditioned-place preference) ?

Pour tenir compte de l'effet position, nous appèlerons position H (habituelle) la position où l'alcaloïde a été initialement présenté aux animaux durant les 14 jours du pré-test par opposition à la position N (nouvelle) où les animaux n'ont jamais rencontré l'alcaloïde durant le pré-test. La consommation sur chaque position en phase II a été exprimée en proportion (ou en %) de la consommation sommée sur les deux positions. Les lois de la probabilité voudraient que nos valeurs varient de 0 à 1, et la valeur 0,5 correspond donc à une consommation identique sur les deux positions. L'alcaloïde qui augmente la consommation au-dessus de 0,5 sera renforçateur, celui qui baisse la consommation au-dessous de 0,5 sera aversif. L'analyse de variance de la consommation en position H (bloc : Jour x Traitement) montre un effet très significatif ( $F_{15,120} = 75; P \leq 2.10^{-53}$ ) du traitement et l'absence d'un effet jour ( $F_{8,120} = 1,41; P \leq 0,2$ ). En position N, l'analyse de variance montre un effet très significatif ( $F_{15,120} = 59; P \leq 5.10^{-48}$ ) du traitement et la présence d'un effet jour au seuil de la signification ( $F_{8,120} = 2,03; P \leq 0,048$ ). La présence d'un effet Jour uniquement en position N démontre la contribution de l'apprentissage à la consommation des solutions.

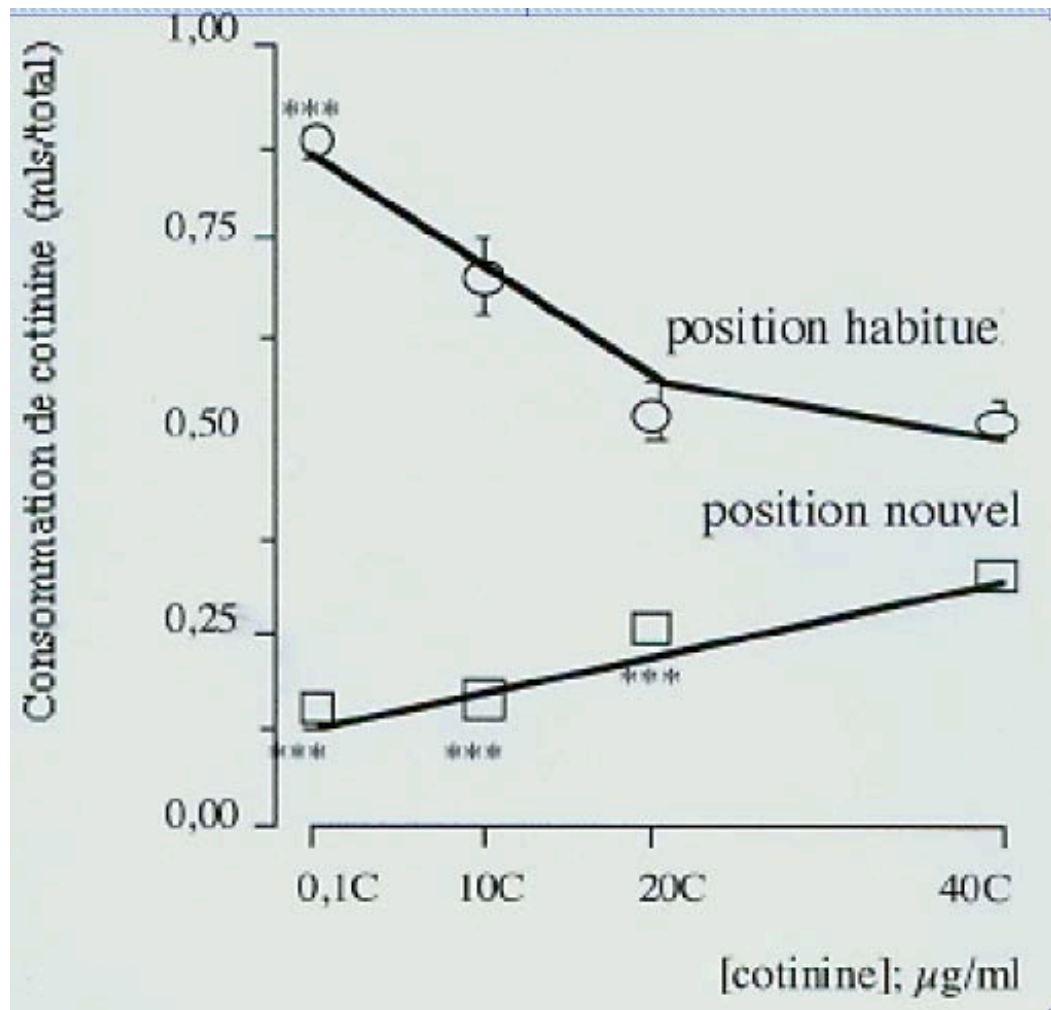
**A- 3- a- Effets CPP de la cotinine et désensibilisation.** La cotinine dans l'eau de boisson affecte la consommation suivant la position H ou N (Fig. 34). En position H, la cotinine est un renforçateur alors qu'en position N, elle est un aversif. Les deux effets de la cotinine désensibilisent aux fortes doses (Fig. 34).

**A- 3- b- Effets CPP de la nicotine et absence de désensibilisation et d'influence de la cotinine.** La nicotine seule ou en présence de cotinine dans l'eau de boisson est un aversif aussi bien dans la position H que N (Fig. 35). L'absence d'influence de la cotinine montre que les effets de la nicotine sont dominants. Les effets de la nicotine ne désensibilisent pas (Fig. 35).

## A- CROSS TALK ENTRE LES MECANISMES DE LA RECOMPENSE DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE CHEZ LA SOURIS

# MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA

## NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON



**Figure 34. Effet CPP de la cotinine et sa désensibilisation.** La consommation a été décomposée suivant la position N et H et exprimée en proportion de la consommation totale (N + H). Les valeurs du contrôle averti (ayant appris à consommer sur les deux positions, voir § A-1 c-) sont présentées sur la Fig. 35.

Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SEM (erreur à la moyenne) des volumes consommés sur une période de 18 jours. L'eau et la cotinine sont présentées dans des biberons et la consommation sur un biberon est exprimée par rapport à la consommation sommée sur les deux biberons suivant la position habituelle ou nouvelle et analysée par ANOVA.

Valeurs des contrôles : En H, naïf  $0,66 \pm 0,03$  ; averti (ayant appris)  $0,53 \pm 0,03$ .

En N, naïf  $0,34 \pm 0,03$  ; averti (ayant appris)  $0,47 \pm 0,03$ .

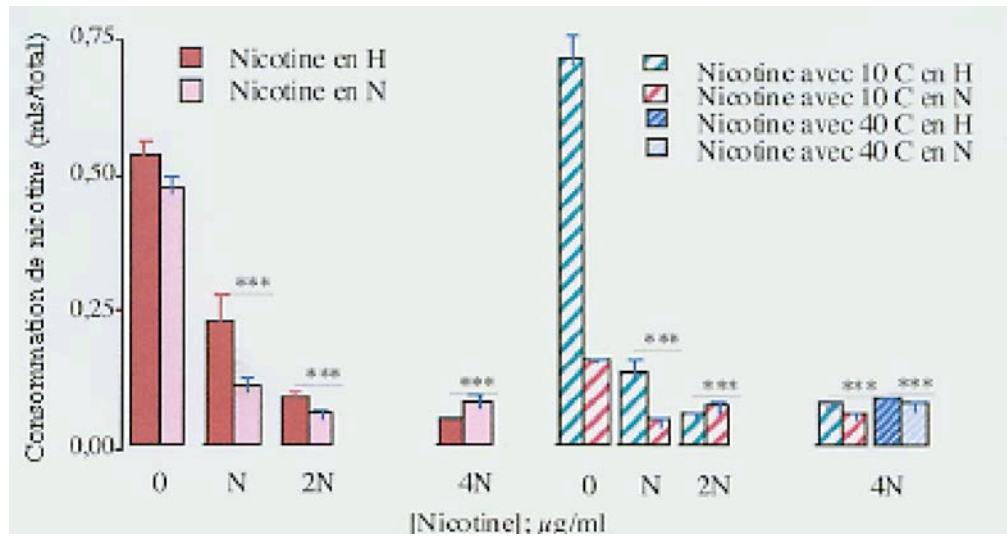
\*\*\*, très significatif par rapport au contrôle averti. Scheffé.

### A- CROSS TALK ENTRE LES MECANISMES DE LA RECOMPENSE DE LA NICOTINE ET DE LA

#### COTININE CHEZ LA SOURIS

# MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA

## NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON



**Figure 35. Effets CPP de la nicotine et absence de désensibilisation et d'influence de la cotinine.** La consommation a été décomposée suivant la position H et N et les valeurs en H et N des contrôles sont indiquées dans la légende de la Fig. 34.

Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SEM de la consommation de la nicotine seule ou en présence de cotinine comme indiquée dans la légende de la Fig. 34.

\*\*\*, très significatif par rapport au contrôle averti. Scheffé.

**Conclusion 3** Nous retiendrons que la décomposition de la consommation suivant la position H et N montre que la nicotine et la cotinine dans l'eau de boisson affecte la valeur de la récompense de l'eau d'une manière CPP (conditioned place preference). La cotinine est un renforçateur positif en H et négatif en N et ses effets désensibilisent. La nicotine est un renforçateur négatif en H, en N, seule et en présence de cotinine. Ses effets augmentent et ne désensibilisent pas.

**A- 4- Généralisation** nous avons considéré les situations suivantes :

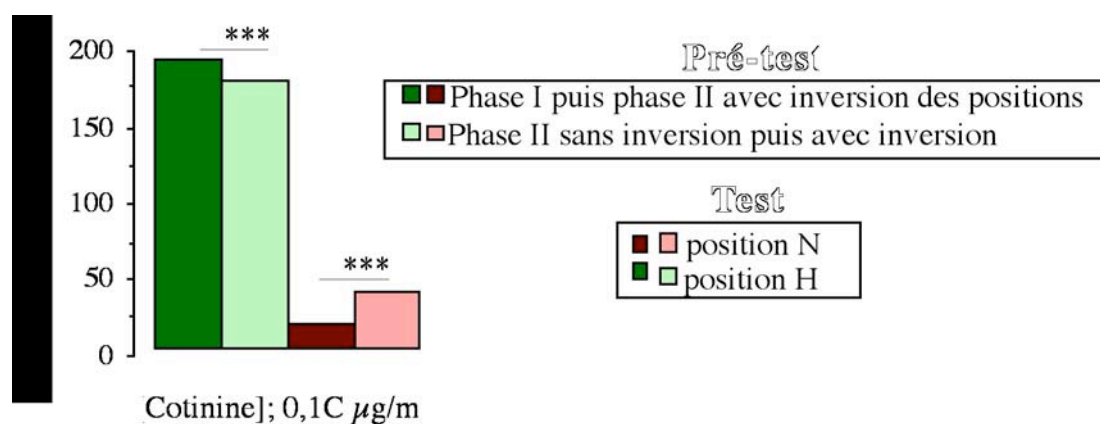
**A- 4- a- La position initiale et l'accès directe à deux sources n'influencent pas l'acquisition des effets CPP de la cotinine.** Nous avons reproduit l'expérience avec la dose active de cotinine (soit 0,1C)

### A- CROSS TALK ENTRE LES MECANISMES DE LA RECOMPENSE DE LA NICOTINE ET DE LA

#### COTININE CHEZ LA SOURIS

## MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON

qui produit des effets opposés (Fig. 34), et avec un accès direct à deux sources de solution (phase II) sans inversion des positions de l'alcaloïde et de l'eau pendant 14 jours, puis avec inversion de la position de l'alcaloïde et l'eau pendant 18 jours. Dans cette expérience, l'alcaloïde est placé dans la position où les animaux n'ont jamais rencontré le biberon d'eau. L'analyse de variance à deux voies sans réplication. (bloc : Jour x Traitement) des volumes journaliers consommés par groupe de 10 souris sur chacune des deux positions montre un effet très significatif du traitement ( $F_{8,104} = 101$ ;  $P \leq 1,6.10^{-45}$ ) et l'absence de l'effet jour ( $F_{13,104} = 0,65$ ;  $P \geq 0,80$ ). La disparition de l'effet jour confirme que l'apprentissage de la consommation intervient significativement lors des augmentations des doses. Les résultats obtenus montrent que les effets renforçateur en H et aversif en N de la cotinine se développent indépendamment du fait que l'accès soit d'emblée double et que la cotinine soit présentée dans une position jamais utilisée (Fig. 36).



**Figure 36. Constance des effets renforçateurs positifs et négatifs de la cotinine.** Les valeurs comparent la consommation en N et H décomposée comme décrit dans la légende de la Fig. 34 de deux groupes de 10 souris prétraités 14 jours par la cotinine imposée ou au choix d'emblée sans inversion des positions. De plus, la cotinine au choix est présentée dans la position où les animaux n'ont jamais rencontré le biberon d'eau. \*\*\*, très significatif par rapport au contrôle averti. Scheffé.

Remarquez l'absence de différence significative entre les deux groupes.



# MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON

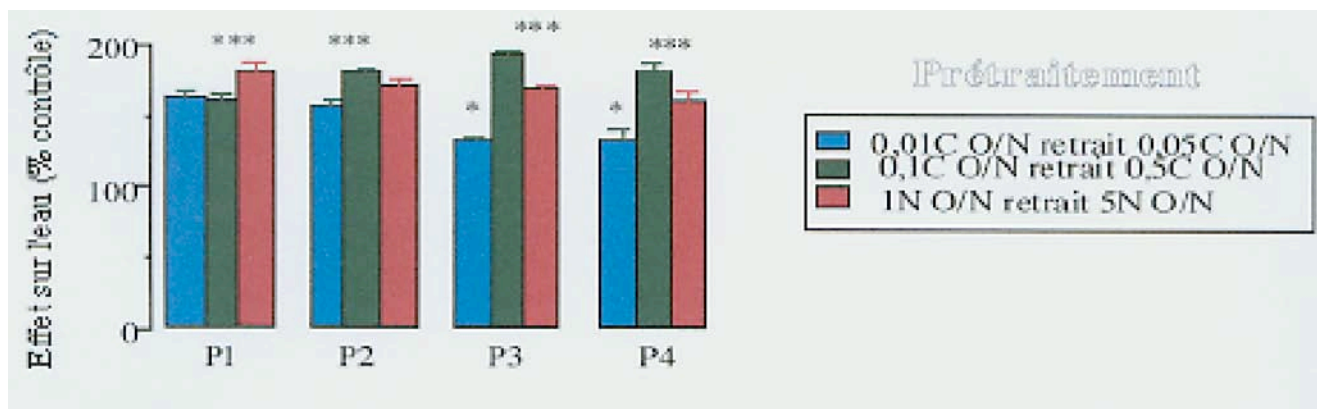
**A- 4- b- Indépendance des effets CPP des alcaloïdes : potentialisation et réversion.** Nous avons utilisé d'emblée 3 choix avec une solution d'eau dans la position habituelle, une solution de cotinine 1C et de nicotine 1N. Les trois solutions sont présentées à trois groupes de 10 animaux et un groupe avec trois solutions d'eau sert de contrôle de la consommation sur chacune des trois positions. Les groupes ont été prétraités à deux occasions par l'administration une nuit de la cotinine (0,01C ou 0,1C) ou de la nicotine (N), suivie d'une semaine sans traitement et l'eau disponible puis à nouveau, nous avons administré 5 fois la concentration initiale, soit 0,05C, 0,5C et 5N, une nuit. Les groupes ont eu ensuite un accès direct aux trois solutions (eau, nicotine 1N et de cotinine 1C) sans inversion des positions, mais avec une dilution des solutions par 3 à chaque période de 14 jours (périodes P1 à P4). Les consommations sur chaque position ont été exprimées en % de la consommation totale et soumises à une analyse de variance à deux voies sans réplication. Les résultats de l'analyse de variance (bloc : Jour x Position) montre un effet significatif ( $F_{3,28} = 5,65; P \leq 8,7.10^{-3}$ ) de la position et l'absence d'un effet jour ( $F_{14,28} = 0,037; P \leq 1$ ).

**A- 4- b- 1- Absence d'hypodipsia** l'analyse de variance (bloc Jour x Traitement) montre un effet très significatif sur la consommation d'eau ( $F_{12,98} = 38; P \leq 2.10^{-31}$ ). Les trois groupes consomment plus d'eau que le contrôle dès P1. Le groupe 0,05C se distingue des autres dès P3 par une baisse de la consommation d'eau (Fig. 37).

**A- 4- b- 2 Maintient de l'aversion de la nicotine** l'analyse de variance (bloc : Jour x Traitement) montre un effet très significatif sur la consommation de nicotine ( $F_{12,98} = 26; P \leq 5.10^{-25}$ ). Les trois groupes montrent une aversion pour la nicotine (Fig. 38), le groupe 0,5C montre dès P3 une aversion plus importante pour la nicotine sans se distinguer significativement des autres (Fig. 38).

## A- CROSS TALK ENTRE LES MECANISMES DE LA RECOMPENSE DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE CHEZ LA SOURIS

# MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON



**Figure 37. Absence d'effet hypodipsia dans le choix multiple.** Les groupes ont été différenciés par prétraitement à deux occasions : une administration une nuit de la cotinine (0,01C ou 0,1C) ou de la nicotine (N) suivie d'une semaine de retrait (l'eau *ad libitum*), puis administration de 5 fois la concentration initiale, soit 0,05C, 0,5C et 5N, une nuit. Les groupes ont eu ensuite un accès direct aux trois solutions (eau, nicotine 1N et de cotinine 1C) sans inversion des positions, mais avec une dilution des solutions par 3 à chaque période de 14 jours (périodes P1 à P4). La consommation a été décomposée suivant la position eau E, nicotine N et cotinine C et exprimée en proportion de la consommation totale (E+N+C) et soumises à une analyse de variance à deux voies sans réplication. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SEM (erreur à la moyenne) au cours des périodes P1 à P4 de dilution des alcaloïdes.

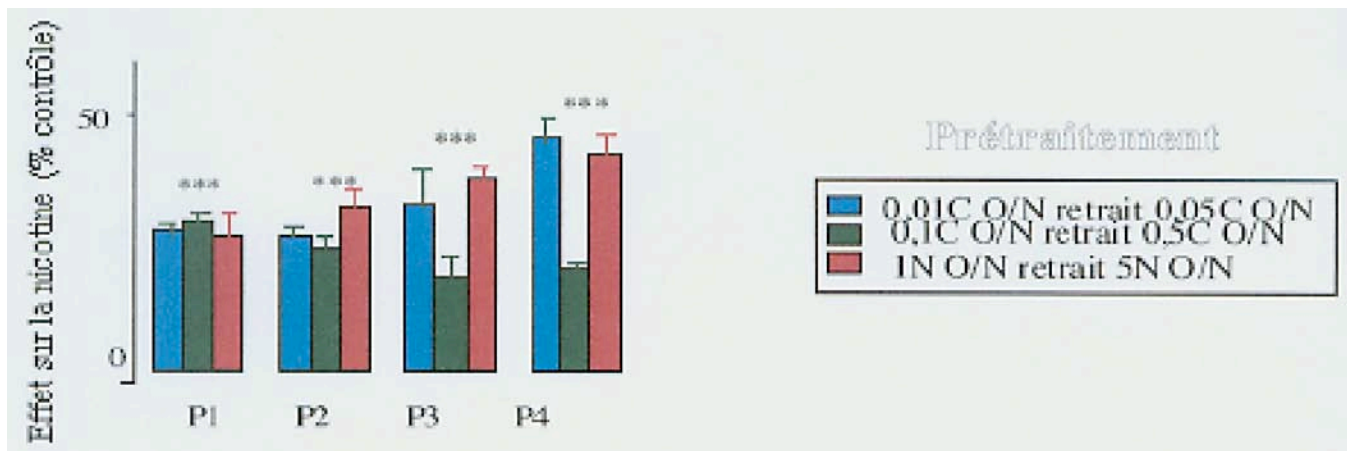
\*,  $P \leq 0,05$  ; \*\*\*, très significatif par rapport au contrôle. Scheffé.

La valeur du contrôle est  $0,47 \pm 0,01$ .

Abréviations : N, nicotine ; C, cotinine dose relative ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) ; O/N une nuit (overnight).

P1 à P4, périodes successives de dilution des alcaloïdes par 3.

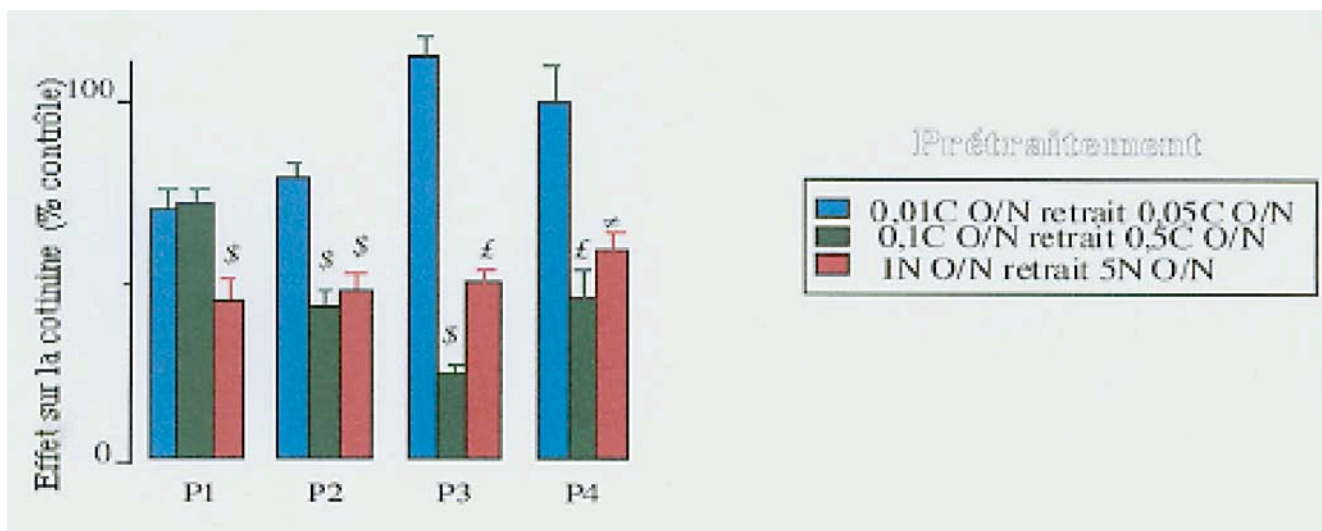
# MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON



**Figure 38. Maintient du renforcement négatif de la nicotine dans le choix multiple.** Même légende que Fig. 37.

\*,  $P \leq 0,05$  ; \*\*\*, très significatif par rapport au contrôle. Scheffé.

La valeur du contrôle est  $0,27 \pm 0,01$ .



**Figure 39. Réversion et potentialisation du renforcement négatif de la cotinine.** Même légende que Fig. 37.

≠,  $P \leq 0,05$  ; £,  $P \leq 0,01$ , §, très significatif par rapport au contrôle. Scheffé.

La valeur du contrôle est  $0,27 \pm 0,02$ .

# MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON

**A- 4- b- 3 Réversion et potentialisation des effets aversifs de la cotinine.** L'analyse de variance (bloc : Jour x Traitement) montre un effet très significatif sur la consommation de cotinine ( $F_{12,97} = 17; P \leq 9.10^{-19}$ ). La comparaison des groupes (Fig. 39) montre une aversion pour la cotinine significative dans le groupe N, une aversion dans le groupe 0,5C, qui devient significative dès P2 et une absence d'aversion dans le groupe 0,05C (Fig. 39). Ainsi, l'aversion de la cotinine est modulable par un prétraitement pharmacologique.

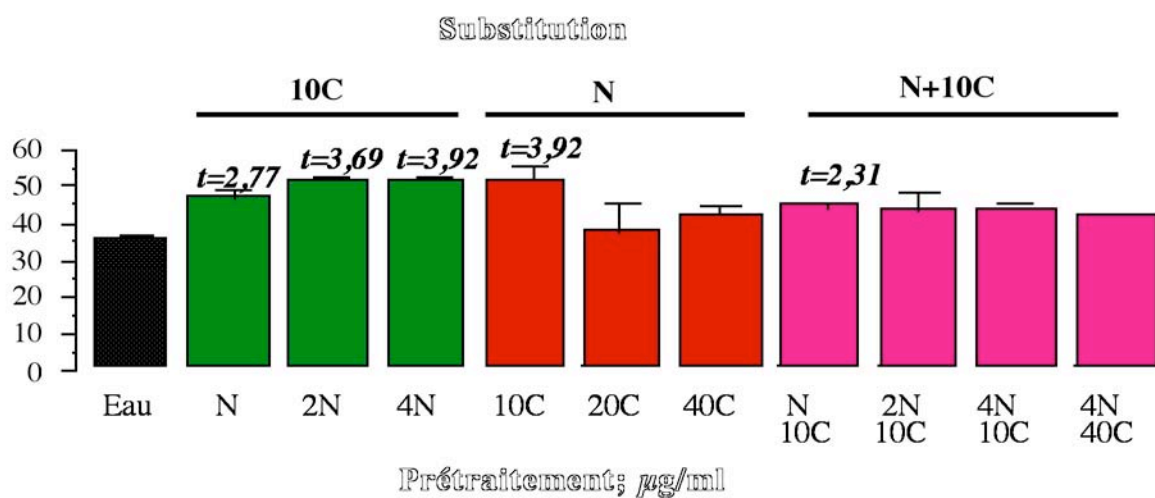
**Conclusion 4** Nous retiendrons que le renforcement positif et négatif de la cotinine se développe indépendamment de l'accès multiple (direct ou non) et de la position initiale (déjà utilisée ou non). La manipulation pharmacologique peut inhiber le renforcement négatif de la cotinine. Le renforcement est potentialisé par la dilution. Dans les mêmes conditions, le renforcement négatif de la nicotine n'est pas affecté.

**A- 5- Cross talk entre les effets renforçateurs de la nicotine et de la cotinine.** En phase II, nous avons montré une aversion en position N pour la cotinine (Fig. 34) et la nicotine (Fig. 35). En phase III, nous avons substitué les doses (1N-4N) de nicotine avec une seule dose de cotinine (C10) et vice-versa en position N pendant deux jours (Fig. 32). Les résultats obtenus ne montrent, au seuil de Scheffé, aucun effet hypodipsia durant les deux jours de substitution (Fig. 40). Au contraire, le pré-traitement par la nicotine stimule très significativement, et de manière dose dépendante, la consommation de la cotinine qui passe du renforcement négatif au renforcement positif (Fig. 41). Le pré-traitement par la cotinine stimule la consommation de la nicotine de manière saturable, mais ne transforme pas son renforcement négatif en renforcement positif (Fig. 41). Le pré-traitement par les mélanges croissants n'a pas d'effet sur consommation du mélange le plus faible, le renforcement négatif est maintenue (Fig. 41).

## A- CROSS TALK ENTRE LES MECANISMES DE LA RECOMPENSE DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE CHEZ LA SOURIS

# MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON

**Conclusion 5** Nous retiendrons que le pré-traitement par la cotinine inhibe le renforcement négatif de la nicotine, alors que le pré-traitement par la nicotine transforme le renforcement négatif de la cotinine en renforcement positif. Ces résultats démontrent que les mécanismes du renforcement négatif et positif, bien que dissociables, communiquent entre eux (cross talk) et sont modulables par la manipulation pharmacologique. La nicotine ne produit que le renforcement négatif alors que la cotinine peut produire le renforcement positif et négatif.

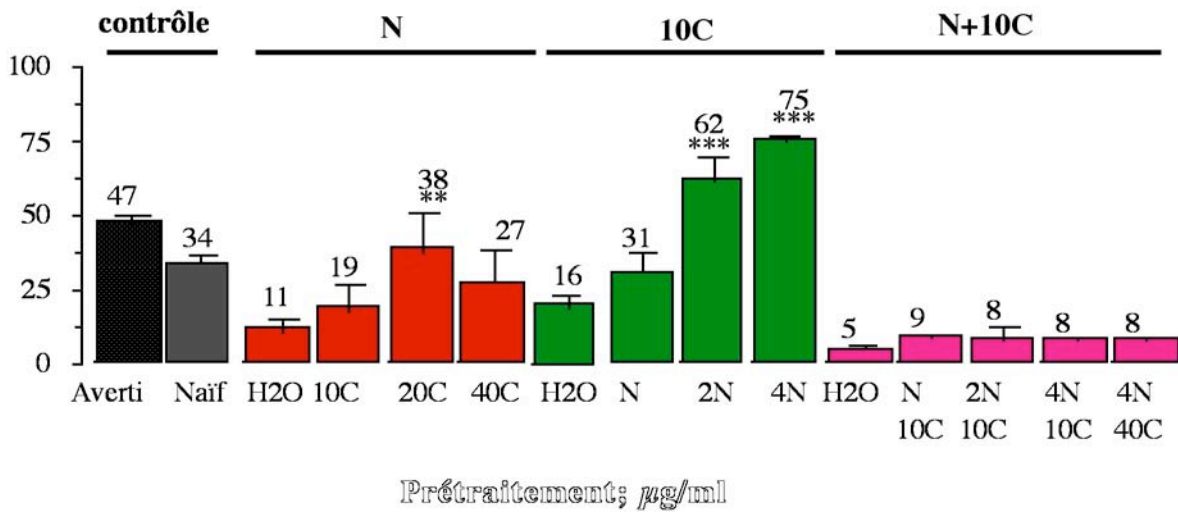


**Figure 40. La substitution ne produit pas d'effet hypodipsia.** La consommation d'eau et des alcaloïdes a été sommée (imposé) comme décrit dans la légende de la Fig. 32. Les valeurs représentent la moyenne ± SEM (erreur à la moyenne) de la consommation totale (eau + alcaloïde) pendant deux jours de substitution. Le biberon d'eau et la solution d'alcaloïde ont été présentés en position H et N, respectivement.

Remarquez que la consommation totale n'est pas significativement différente du contrôle au seuil de Scheffé. Les valeurs du  $t$  sont données à titre d'indication.

Remarquez la tendance à l'augmentation de la consommation totale surtout dans les groupes prétraités à la nicotine et 10C.

**MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA  
NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON**



**Figure 41. Le prétraitement par la nicotine transforme totalement le renforcement négatif de la cotinine en N en renforcement positif alors que l'inverse n'est pas totalement vrai.** La consommation a été décomposée suivant la position H et N et exprimée en % de la consommation totale (H+N) comme décrit dans la légende de la Fig. 34. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SEM (erreur à la moyenne) des volumes consommés des alcaloïdes en position N sur deux jours de substitution (groupes traités) et 9 jours (groupes contrôles).

\*\* ,  $P < 0,01$ ; \*\*\*, très significatif par rapport au contrôle. Scheffé.

Remarquez la conversion dose dépendante du renforcement négatif de la cotinine en renforcement positif.

Remarquez l'inhibition dose dépendante du renforcement négatif de la nicotine

# **MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON**

## **DISCUSSION**

D'un côté, la consommation d'eau (Yoshida et al., 1992; Young et al., 1992) et de nourriture (Yoshida et al., 1992) augmente la libération de la dopamine dans le système meso-limbique. Cependant, à l'exception de son administration dans un nutriment liquide (Halladay et al., 1999), la nicotine dans l'eau de boisson *ad libitum* produit une hypodipsia c'est-à-dire inhibe la consommation (Naquira and Arqueros, 1978; Rowell et al., 1983; Kita et al., 1985; Yamanaka et al., 1985; Murrin et al., 1987; Yamanaka et al., 1987; Qiu et al., 1992; Pietila et al., 1995; Wong and Ogle, 1995; Pietila et al., 1996; Pietila et al., 1998; Gaddnas et al., 2000; Pietila and Ahtee, 2000; Eliakim et al., 2002). De l'autre côté, l'administration de la nicotine dans l'eau de boisson est un modèle expérimental valable pour étudier ses effets (Gaddnas et al., 2000; Pietila and Ahtee, 2000). Dans ce modèle d'étude, la nicotine passe dans le cerveau et affecte le métabolisme de la dopamine (Pietila et al., 1995). Elle induit la tolérance (Pietila et al., 1996), module ses récepteurs et affecte la motricité (Pietila et al., 1998). L'hypodipsia étant incompatible avec le renforcement positif de la nicotine dans l'addiction tabagique, elle a été interprétée par son goût désagréable (Naquira and Arqueros, 1978; Murrin et al., 1987; Le Houezec et al., 1989) ou par son effet antidiurétique (Mansner and Mattila, 1975).

Dans la phase I de la présente étude, nous arrivons à la même conclusion (Fig. 33 ; Imposé). Cependant, l'inclusion de la cotinine dans l'essai nous a permis d'observer d'une part une légère stimulation de la consommation à 10C et surtout une potentialisation de l'aversion de la nicotine dans les mélanges (Fig. 33 ; Imposé). Ces résultats d'une part et la détection d'un effet Jours très significatif sur la consommation (Fig. 32 ; Phase I) d'autre part ne pouvaient pas être interprétés sur la seule base d'un effet aversion liée au goût ou antidiurétique de la nicotine. Ces résultats permettent de postuler que l'essai avec une seule source de solution n'est pas suffisant pour connaître les mécanismes régulateurs des comportements d'abreuvement et l'activité de la cotinine. Ils imposent de considérer la consommation comme un phénomène comportemental d'apprentissage quotidien de la consommation des doses des

## **MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON**

alcaloïdes. Pour tester ces hypothèses, nous avons donné aux animaux le choix entre l'eau et les solutions des alcaloïdes (Fig. 33 ; Choix). De plus, pour la même raison d'apprentissage nous avons échangé quotidiennement les positions de l'alcaloïde et de l'eau en Phase II (Fig. 33 ; Choix). Les résultats obtenus montrent, en accord avec l'hypothèse de l'apprentissage, une forte accentuation de l'effet Jour (Fig. 32 ; Phase II) et la disparition de l'effet hypodipsia de la nicotine (Fig. 33 ; Choix). Ces résultats démontrent que l'effet hypodipsia de la nicotine en Phase I n'est pas lié à un effet antidiurétique puisqu'en Phase II, elle stimule significativement la consommation totale lorsqu'elle est seule ou en présence de cotinine dans les mélanges (Fig. 33 ; Choix). Ces résultats montrent que la consommation de solution est affectée par les doses des alcaloïdes et l'apprentissage. L'absence d'effet de la cotinine en Phase I et II ne permet pas d'exclure qu'elle est active, puisque sa présence renforce les effets de la nicotine de manière linéaire en Phase I et de manière non linéaire en Phase II (Fig. 33). Nous avons donc décidé de décomposer la consommation de la Phase II suivant la position H (habituelle) et N (nouvelle) comme dans un test de conditionnement de type place préférence (CPP). Dans cette analyse, l'effet Jour a totalement disparu en H et a persisté au seuil de la signification ( $P \leq 0,048$ ) en N. Ces résultats confirment que l'effet Jour est bien lié à l'apprentissage de la consommation des doses des alcaloïdes. Sa disparition en H montre que les animaux ont déjà appris à consommer ces doses dans cette position et sa persistance en N montre que dans cette position, l'apprentissage de la consommation de ces doses n'est pas loin d'être achevé. D'autre part, nous avons confirmé la contribution de l'apprentissage à la consommation de deux manières. Dans un premier temps, nous avons montré, par le test de l'hypothèse nulle, que la consommation d'eau est légèrement affectée par l'apprentissage (voir §A.1.c). Dans un second temps, nous avons annulé l'effet Jour lorsque nous avons restreint l'analyse à une seule dose de cotinine (Fig. 36) ou nicotine (non montré). Cette analyse montre que la nicotine et la cotinine dans l'eau de boisson affectent différemment le renforcement de la consommation des solutions. La nicotine est aversive en H et N (Fig. 35) et la cotinine est un renforçateur en H et un aversif en N (Fig. 34). De plus, les effets de la cotinine désensibilisent d'une manière dose dépendante et ceux de la nicotine ne désensibilisent pas.

### **A- CROSS TALK ENTRE LES MECANISMES DE LA RECOMPENSE DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE CHEZ LA SOURIS**



## **MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON**

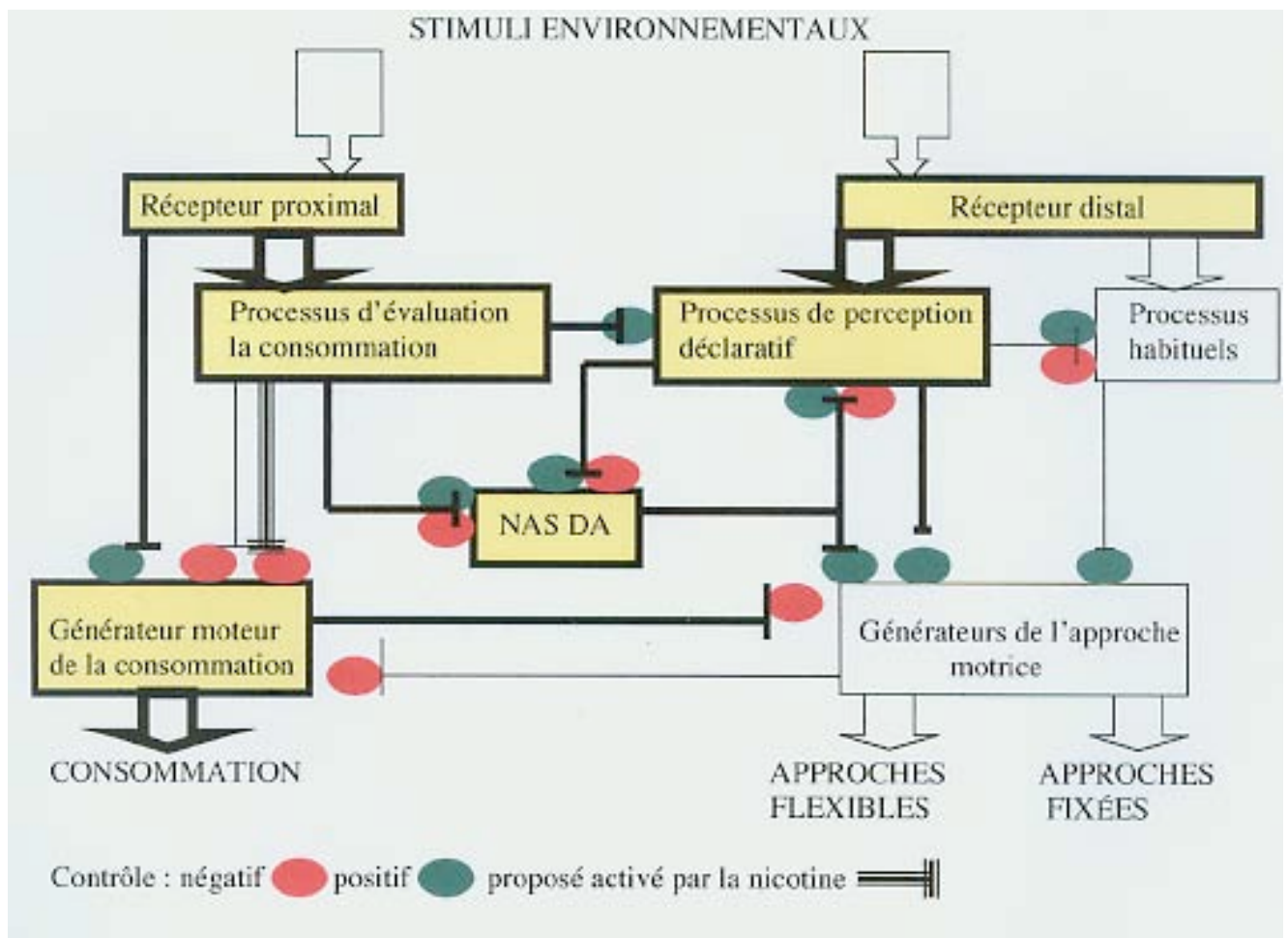
D'autre part, les effets renforçateurs et aversifs de la cotinine se développent indépendamment de la position initiale déjà utilisée ou non par l'animal pour s'abreuver (Fig. 36). De plus, l'effet aversif de la nicotine et de la cotinine peut être obtenu même lorsque l'accès au choix multiple est direct (Fig. 37-39). Plus précisément, l'effet aversif de la cotinine peut être annulé (Fig. 39 ; groupe 0,01Cx5) ou potentialisé LTP (long term potentiation) lors des dilutions (Fig. 39 ; groupe 0,1Cx5) par une courte manipulation pharmacologique. La manipulation pharmacologique de longue durée (Fig. 41) induit l'effet renforçateur de la cotinine et inhibe l'effet aversif de la nicotine. Ces résultats démontrent un inter-play (ou cross-talk c'est-à-dire un lien croisé) entre les effets de la nicotine et de la cotinine sur les mécanismes de la récompense. Ils sont en accord avec les mécanismes de renforcement (Berridge, 1996) et le rôle de la dopamine (Berridge and Robinson, 1998) et du système meso-accumbens (Ikemoto and Panksepp, 1999) dans la théorie de la récompense. Ces théories permettent de proposer que les renforcements négatifs de la nicotine et positifs de la cotinine sont des approches flexibles vers la performance vitale (Ikemoto and Panksepp, 1999) en accord avec leur toxicité relative (Riah et al., 1999). Les effets de la cotinine sur la libération de dopamine passent par des récepteurs dans le système dopaminergique du meso-accumbens et sont prompts à la désensibilisation, alors que ceux de la nicotine passent par des récepteurs robustes à la désensibilisation (Clarke and Reuben, 1996) dans d'autres systèmes comme le système dopaminergique robuste nigro-striatal continuum (Ikemoto and Panksepp, 1999). Dans l'ensemble, les effets de ces alcaloïdes traduisent une approche flexible pour éviter la toxicité (Ikemoto and Panksepp, 1999). De plus, dans le contexte habituel (H) les taux de dopamine du meso-accumbens sont bas (Ikemoto and Panksepp, 1999) et supportent une stimulation par la cotinine (Fig. 34). Au contraire dans le contexte de nouveauté (N) les taux sont haut (Rebec et al., 1997; Ikemoto and Panksepp, 1999) et ne supportent pas une stimulation par la cotinine (Fig. 34). Cependant, comme l'administration de la cotinine down régule ses récepteurs (Chapitre III et VC), ses effets sont atténués de sorte que les animaux se dirigent vers une dérégulation de l'homéostasie de la dopamine (hédoniste) et pénètrent dans la spirale de détresse du cycle des addictions (Koob and Le Moal, 1997) (cette thèse ; Fig. 60-61). Les effets de la nicotine sont

### **A- CROSS TALK ENTRE LES MECANISMES DE LA RECOMPENSE DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE CHEZ LA SOURIS**

## **MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON**

insensibles au contexte de nouveauté (Fig. 36). Ces résultats indiquent que son action aversive passe par d'autres structures rigides comme le système dopaminergique robuste nigro-striatal continuum plutôt que par le système meso-accumbens qui est sensible à la nouveauté (Rebec et al., 1997; Ikemoto and Panksepp, 1999). Nos résultats montrent qu'un traitement à la nicotine sensibilise totalement l'effet renforçateur positif de la cotinine (Fig. 41) et de l'autre côté, qu'un traitement à la cotinine inhibe totalement l'effet renforçateur négatif (aversion) de la nicotine (Fig. 41). Ces résultats sont en accord avec le fait que les effets positifs et négatifs des renforçateurs bien que dissociables, sont inter-modulables (Berridge, 1996). Ils démontrent que pour une performance vitale maximale, l'homéostasie de la dopamine intègre l'ensemble des informations émanant des différentes régions cérébrales (Koob and Le Moal, 1997). Enfin, nos résultats montrent que les mélanges testés sont toujours aversifs (Fig. 41). Ces résultats suggèrent, pour la même raison de performance vitale, que ces mécanismes sont structurés de manière à ce que les mécanismes du renforcement négatif (évitement ou aversion) soient dominants par rapport aux mécanismes du renforcement positif (hédonisme ou plaisir) comme illustré ci-dessous (Fig. 42).

**MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA  
NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON**



**Figure 42.** Modèle conceptuel illustrant les unités majeures impliquées dans les réponses consommatoires et les processus d'attribution en relation avec les stimulants environnementaux selon Ikemoto et Panksepp (Ikemoto and Panksepp, 1999). L'aversion de la nicotine est illustrée par son activation de l'efférent émanant des centres (processus) d'évaluation de la consommation. Celui n'est pas actif dans le modèle original.

**A- CROSS TALK ENTRE LES MECANISMES DE LA RECOMPENSE DE LA NICOTINE ET DE LA  
COTININE CHEZ LA SOURIS**

**MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT  
DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON**

**CHAPITRE V. MÉCANISMES ET EFFETS DE  
L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET  
DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON**

# **MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON**

## **ABSTRACT**

Drugs affecting pain perception and motor activity are generally addictive. In the present study, we have compared spinal pain perception, weight gain and open-field activity, after short discontinuous, continuous and long-term continuous alkaloid administration *ad libitum* in drinking water. We have compared effects of nicotine, cotinine and some of their mixtures when presented in the sole source of drinking (imposed access) or in presence of a second source of water (choice access). Other groups were administered overnight, tail-flick was measured in the morning and animals withdrawn for one-week prior to evaluation of the open-field activity (withdrawal 1). Certain of these groups were administered again overnight with 5-fold increment of initial doses (repeat) and tail-flick and open-field measured as before (withdrawal 2).

Overnight administration of nicotine (0,4N-1N) or cotinine (0,01C-1C) produced significant but weak analgesia, which increased in the case of nicotine with both doses and repeat, while it increased with repeat instead of doses of cotinine. Under continuous administration, cotinine stimulated weight gain, nicotine had no effect, however cotinine potentialized nicotine-induced inhibition of weight gain in a manner that showed no linearity regarding doses in mixtures or treatment duration. At one week of continuous administration, nicotine stimulated motor-emotion (ME), motor (M), distal-exploration (ED) and inhibited proximal-exploration (EP). Under the same conditions, cotinine administration at doses equivalent to tenth nicotine had no effects. Nicotine withdrawal 1 inhibited ME and stimulated M. Nicotine withdrawal 2 stimulated ME and withdrawal 1 and 2 stimulated anxiety (AT). Cotinine withdrawal 1 and 2 from doses equivalent to hundredth nicotine, stimulated anxiety. Cotinine withdrawal 1 stimulated M while withdrawal 2 inhibited M. Increasing doses (to 4N for nicotine and 40C for cotinine) and treatment duration showed anxiolytic actions for both drugs. There was desensitization of nicotine effects on M and ME, when administered alone, and on ED and EP, when administered with cotinine in mixtures. Under the same conditions, cotinine showed biphasic actions on ME, with inhibition at doses lower than 10C and stimulation at higher doses.

As a conclusion, the administration in drinking water is a useful model to study the effects of the alkaloids and their withdrawal. The modulations seen in mixtures-treated mice suggest that

## **B- MODULATION DE LA PERCEPTION DE LA DOULEUR, DU GAIN DE POIDS ET DE L'ACTIVITE OPENFIELD**

## **MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON**

cotinine had affected nicotine biodisposition. The activation of motor and anxiety responses in withdrawal-treated mice suggests that both alkaloids are addictive.

We propose that cotinine, at doses equivalent to tenth and hundredth nicotine, affects dopamine and opioide systems.

**Key words** nicotine and cotinine; drinking water; sensitization and desensitization; open-field activity; pain perception; weight gain; mice.

# **MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON**

## **RÉSUMÉ**

Les drogues affectant la perception de la douleur et la motricité sont généralement addictives. Dans l'étude présente, nous avons comparé la perception de la douleur d'origine spinale, la prise de poids et l'activité openfield après administration courte continue ou discontinuée, et après administration prolongée continue des alcaloïdes *ad libitum* dans l'eau de boisson. Nous avons comparé l'effet de la nicotine, de la cotinine et certains de leurs mélanges lorsqu'ils ont été présentés dans la seule source d'eau (accès imposé) ou en présence d'une autre source d'eau (accès au choix). D'autres groupes ont été traités une nuit, l'analgésie mesurée le lendemain et les alcaloïdes retirés pendant une semaine avant l'évaluation de l'activité openfield (retrait 1). Parmi ces groupes, certains ont été traités à nouveau une nuit avec augmentation par 5 de la dose initiale (répétition), l'analgésie et l'activité openfield ont été mesurées comme décrit ci-dessus (Retrait 2).

L'administration une nuit de la nicotine (0,4N-1N) ou de la cotinine (0,01C-1C) a produit une analgésie significative mais faible qui a augmenté, dans le cas de la nicotine, avec la dose et la répétition alors qu'elle a augmenté avec la répétition plutôt que la dose de cotinine. En administration continue, la cotinine a stimulé la prise de poids, l'effet de la nicotine n'atteint pas le seuil de signification cependant, la cotinine a potentialisé l'effet inhibiteur de la nicotine sur la prise de poids d'une manière non linéaire par rapport à la dose dans les mélanges et à la durée du traitement. À une semaine d'administration continue, la nicotine a stimulé l'activité motrice émotionnelle (ME), motrice (M) et l'exploration distale (ED) et déprime l'exploration proximale (EP). Dans les mêmes conditions, l'administration de la cotinine au dixième de la nicotine n'affecte aucun paramètre. Le retrait 1 de la nicotine déprime ME et stimule M et le retrait 2 stimule ME et les deux retraits stimulent l'anxiété (AT). Le retrait 1 et 2 de la cotinine au centième de la nicotine stimule l'anxiété. Le retrait 1 stimule M et le retrait 2 inhibe M. L'augmentation des doses (jusqu'à 4N pour la nicotine et 40C pour la cotinine) et de la durée du traitement a montré l'activité anxiolytique des deux alcaloïdes. Il y'a eu une désensibilisation des effets de la nicotine sur ME et M lorsqu'elle a été administrée seule et sur ED et EP lorsqu'elle a été administrée avec la cotinine dans les mélanges. Dans les mêmes conditions, la

## **B- MODULATION DE LA PERCEPTION DE LA DOULEUR, DU GAIN DE POIDS ET DE L'ACTIVITE OPENFIELD**

## **MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON**

cotinine a montré un effet biphasique sur ME avec une inhibition aux doses inférieures à 10C et une stimulation aux doses au-dessus.

En conclusion, l'administration dans l'eau de boisson est un modèle utile pour étudier les effets de l'administration et du retrait des alcaloïdes. Les modulations observées chez les traités par les mélanges suggèrent un effet de la cotinine sur la biodisposition de la nicotine. L'activation des réponses motrices et d'anxiété chez les animaux traités par le retrait suggère que les deux alcaloïdes produisent une addiction.

Nous pouvons conclure que la cotinine, aux doses équivalentes au dixième et centième de la nicotine, affecte les systèmes de la dopamine et des opioïdes.

**Mots clés** Nicotine et cotinine ; eau de boisson ; sensibilisation et désensibilisation ; activité openfield ; perception de la peine ; prise de poids ; souris.



# **MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON**

## **INTRODUCTION**

Beaucoup de travaux ont suggéré que la nicotine est responsable de la production de la dépendance tabagique (Goldberg et al., 1983; Stolerman and Shoaib, 1991; Stolerman and Jarvis, 1995), puisqu'elle peut maintenir le comportement de quête de la drogue dans les procédures d'auto-administration et de place préférence chez les animaux de laboratoire (Armitage et al., 1968; Henningfield and Goldberg, 1983; Stolerman and Shoaib, 1991), et altère le seuil de l'auto-stimulation intracrâniale (ICSS) (Pradhan and Bowling, 1971; Clarke and Kumar, 1984; Montgomery and Grottick, 1999). De plus, ses propriétés de discrimination du stimulus ont été établies et ont été bloquées ou réduites par les antagonistes nicotiques centraux (Brioni et al., 1997). Les études avec la nicotine et d'autres substances de dépendance suggèrent que l'action des drogues sur la dopamine du mésolimbé est au centre des effets sur la récompense (Clarke, 1990; Koob, 1992). Cependant, au contraire des autres drogues, l'effet renforçateur de la nicotine est tributaire d'environnements restreints (Henningfield and Goldberg, 1983; Sannerud et al., 1994). Le renforcement de l'auto administration par la nicotine (Donny et al., 1998; Shoaib and Stolerman, 1999) est bien plus limité (Cox et al., 1984; Corrigall et al., 1992) que pour les autres classes de drogues (Corrigall and Coen, 1989; Koob and Weiss, 1992; Woolverton, 1992). La nicotine renforce plus efficacement l'auto-administration lorsqu'elle est programmée en second ordre dans un intervalle fixe (Risner et al., 1985; Risner et al., 1988). Dans le test de place préférence conditionnée (CPP), l'effet renforçateur de la nicotine est faible (Clarke and Fibiger, 1987) ou n'est observé qu'après un certain nombre d'administration avant le test (Shoaib et al., 1994). Il est inhibé par l'administration d'un antagoniste du monoxyde d'azote (NO) (Martin and Itzhak, 2000). Lorsque la cotinine a été évaluée en parallèle avec la nicotine dans les tests comportementaux, elle a produit une analgésie (Erenmemisoglu and Tekol, 1994), l'effet inverse de la nicotine dans les tests FI-FR (fixed interval-fixed ratio) (Risner et al., 1985; Goldberg et al., 1989) et une absence d'activité dans le test d'émotivité plus-maze (Brioni et al., 1993). Cependant, les antagonistes de CRF (corticotropin-releasing factor) (Heinrichs et al., 1992) et de la nNOS

## **B- MODULATION DE LA PERCEPTION DE LA DOULEUR, DU GAIN DE POIDS ET DE L'ACTIVITE OPENFIELD**

# **MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON**

(neuronal nitric oxide synthase) (Reddy and Kulkarni, 1998) inhibent l'émotivité plus-maze. Cependant, cette réponse dépend fortement des états du stress initial (Pokk and Vali, 2002).

L'administration de la nicotine dans l'eau de boisson a permis de montrer que c'est un modèle valable pour étudier les effets de la nicotine (Pietila et al., 1995; Pietila et al., 1998; Gaddnas et al., 2000; Pietila and Ahtee, 2000). Cependant, la cotinine n'a jamais été incluse pour la comparaison (Naquira and Arqueros, 1978; Rowell et al., 1983; Kita et al., 1985; Yamanaka et al., 1985; Murrin et al., 1987; Yamanaka et al., 1987; Qiu et al., 1992; Pietila et al., 1995; Wong and Ogle, 1995; Pietila et al., 1996; Pietila et al., 1998; Halladay et al., 1999; Gaddnas et al., 2000; Pietila and Ahtee, 2000; Eliakim et al., 2002). C'est à ce besoin que nous tenterons de répondre, du moins en partie, dans cette étude comparative des effets de la nicotine et de la cotinine dans l'eau de boisson sur la perception de la douleur spinale, la prise de poids et l'activité openfield chez la souris.

## **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

Les effets de l'administration de la nicotine et de la cotinine ont été étudiés chez la souris *Mus musculus*. Les protocoles expérimentaux, impliquant les animaux, étaient en accord avec les directives du *Guide de la Protection et de l'Usage des Animaux de Laboratoire*. Ils ont été approuvés par le Comité Usage et Protection des Animaux de Laboratoire de l'Université Paul Sabatier. Les alcaloïdes ont été mis en solution fraîche tous les soirs dans l'eau de boisson et présentés *ad libitum* comme seule source d'eau (accès imposé) ou en présence d'une seconde source d'eau (accès choix). L'eau sert de contrôle aux effets des alcaloïdes. La croissance pondérale a été suivie par pesée tous les 3-4 jours et constitue par conséquent une habitude des animaux aux stress de la manipulation par l'expérimentateur, préalable à la mesure de l'activité openfield. L'activité openfield a été mesurée dans un champ ouvert de 60 cm de diamètre, sur un fond blanc marqué de case pour comptabiliser les déplacements. Toutes les observations ont été effectuées entre 9 et 13 heures dans une salle d'expérimentation calme et jamais visitée par les animaux avant l'expérimentation. Chaque animal a été déposé au centre du

## **B- MODULATION DE LA PERCEPTION DE LA DOULEUR, DU GAIN DE POIDS ET DE L'ACTIVITE OPENFIELD**

# **MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON**

champ et retiré au bout de 3 min. Certains groupes ont été évalués à deux reprises séparées par un intervalle de temps d'une semaine. Les effets sur le déplacement dans le centre du champ mesure les effets moteur-émotionnels (ME). Dans la périphérie du champ les effets moteurs (M). Le nombre de redressement sur les pattes postérieures sans appui sur la paroi l'exploration distale (Rearing ED). Le nombre de redressement avec appui sur la paroi l'exploration proximale (EP). Les effets sur les réactions de toilettes (AT) et les défécations (AE) mesurent l'anxiété. Les effets sur l'analgésie d'origine spinale ont été mesurés par le test du retrait de la queue (Dambisya and Lee, 1996; Sora et al., 1997) sur un appareil 'tail-flick' APPELEX (FRANCE). Les données ont été analysées suivant les cas par le test de l'hypothèse nulle et ou l'analyse de variance (ANOVA). La normalité a été estimée par le test E/S de David et l'égalité des variances par le test  $S_{i_{\max}}^2/\Sigma(S_i^2)$  de Cochran. Les comparaisons ont été faites par le test de Scheffé.

## **RÉSULTATS**

### **B- I- EFFETS SUR L'ANALGÉSIE SPINALE**

**B- I- 1- Considérations méthodologiques.** La mesure en elle-même a été dupliquée pour chaque individu des groupes constitués au hasard par un deuxième passage dans l'ordre initial dans l'appareil APPELEX. L'analyse de variance (blocs : Groupe x Duplication) montrent un effet très significatif du traitement ( $F_{13,126} = 12,43 ; P \leq 4,27.10^{-17}$ ), du groupe ( $F_{6,126} = 24,48 ; P \leq 4,45.10^{-19}$ ) et aucun effet significatif lié à la duplication de la mesure ( $F_{1,126} = 2,56 ; P \leq 0,12$ ) et l'absence d'interactions ( $F_{6,126} = 2,03 ; P \leq 7.10^{-2}$ ). La moyenne des deux mesures a été utilisée pour établir le temps de retrait de la queue.

**B- I- 2- Analgésie spinale.** L'effet sur l'analgésique spinale de la nicotine et de la cotinine a été jugé par le test de l'hypothèse nulle "δ = 0" et une analyse de variance (ANOVA).

### **B- MODULATION DE LA PERCEPTION DE LA DOULEUR, DU GAIN DE POIDS ET DE L'ACTIVITE OPENFIELD**

## MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON

*Test de "δ = 0"*. La différence individuelle (D = temps après traitement - temps avant traitement) a été calculée et sa moyenne Dm comparée à 0 pour chacun des groupes. Une valeur Dm significativement supérieure à 0 indique un effet analgésique (Tableau XII) :

Les groupes eau ; 0,4N ; 0,01C et 0,4C ne sont pas analgésiés.

Les groupes N ; Nx5 ; 0,01Cx5 ; 0,1C ; 0,1Cx5 et C sont analgésiés (en rouge).

L'effet de la cotinine est saturable dès 0,1C.

Une répétition avec augmentation des doses par 5 (x5) augmente double l'analgésie.

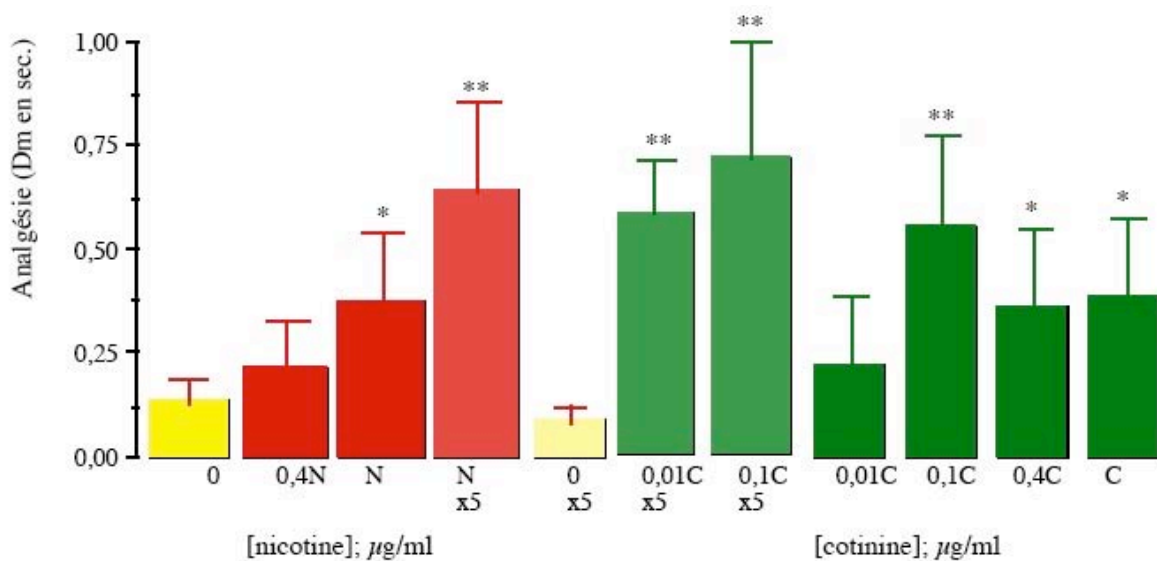
**Tableau XII.** Effet de l'administration *ad libitum* de la nicotine et de la cotinine dans l'eau comme seule source de boisson sur l'analgésie spinale : saturation des effets de la cotinine.

Groupes	Eau	0,4N	N	Nx5	0,01C	0,01Cx5	0,1C	0,4C	0,4Cx5	C
Dm	0,19	0,21	<b>0,37</b>	<b>0,64</b>	<b>0,22</b>	<b>0,58</b>	0,55	<b>0,36</b>	<b>0,72</b>	0,39
Sd	0,23	0,12	0,17	0,22	0,17	0,13	0,22	0,18	0,28	0,18
t	0,83	1,72	2,11	2,83	1,31	4,40	2,48	2,00	2,53	2,102
p(t)	0,8	0,2	<b>0,05</b>	<b>0,02</b>	0,2	<b>0,001</b>	<b>0,05</b>	0,10	<b>0,05</b>	<b>0,05</b>

Remarquez l'analgésie plus importante avec 0,01Cx5 que 0,4C.

**ANOVA** L'analyse de variance confirme un effet très significatif ( $F_{11,108} = 13,45, P \leq 8.10^{-16}$ ) du traitement sur l'analgésie (Fig. 43).

## MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON



\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$  par rapport au contrôle eau. Test de Student, après ANOVA.

**Figure 43.** Effets de l'administration de la nicotine et de la cotinine dans l'eau de boisson sur l'analgésie spinale : saturation des effets de la cotinine.

Remarquez l'augmentation de l'analgésie de la nicotine par la répétition et l'augmentation de la dose. Remarquez l'augmentation de l'analgésie de la cotinine par la répétition plutôt que par l'augmentation de la dose.

**Conclusion 6** Nous retiendrons que l'administration des alcaloïdes dans l'eau de boisson produit une certaine analgésie. Celle-ci augmente pour la nicotine N et sa répétition Nx5, alors que pour la cotinine, elle augmente plus efficacement avec la répétition des faibles doses 0,01Cx5 qu'avec l'augmentation des doses.

### **B- II- EFFETS SUR LA PRISE DE POIDS**

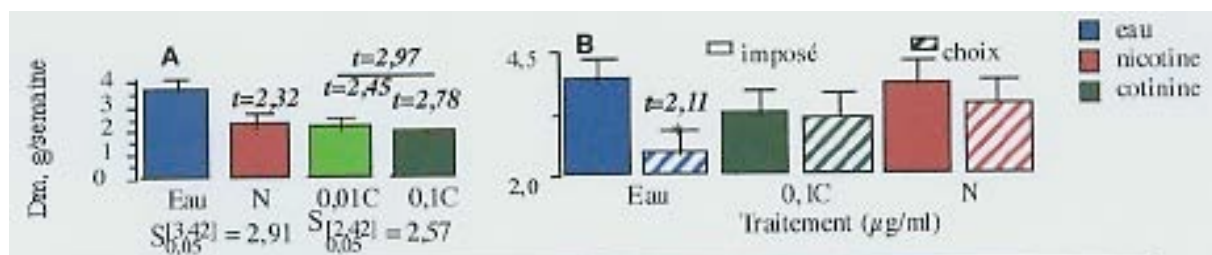
**B- II- 1- Administration et retrait.** Nous avons considéré la moyenne de la différence de pesée individuelle ou du groupe.

**Retrait.** Les variances sont homogènes et la normalité est limitée pour le groupe 0,01C ( $P \leq 0,05$ ) et N ( $P \leq 0,05$ ). L'analyse de variance montre un effet significatif du retrait ( $F_{3,41} = 4,66$  ;  $P \leq 7.10^{-3}$ ) sur la prise de poids (Fig. 44 A).

### **B- MODULATION DE LA PERCEPTION DE LA DOULEUR, DU GAIN DE POIDS ET DE L'ACTIVITE OPENFIELD**

## MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON

**Administration.** Les variances sont homogènes, la normalité acceptable (une source) et limite pour 0,1C ( $P \leq 0,05$  ; deux sources). L'analyse de variance ne montre aucun effet significatif du traitement ( $F_{5,54} = 1,2$  ;  $P \leq 0,32$ ), du groupes ( $F_{2,54} = 0,57$  ;  $P \leq 0,57$ ), de l'accès 1 / 2 sources ( $F_{1,54} = 2,67$  ;  $P \leq 0,11$ ) et des interactions ( $F_{2,54} = 1,09$  ;  $P \leq 0,34$ ) sur la prise de poids (Fig. 44 B). Cependant, l'effet accès est proche de la signification, nous avons comparé les moyennes chez le contrôle qui montre un effet significatif ( $P \leq 0,05$  ;  $S = 2$ ) lié à l'accès.



**Figure 44.** Effet du retrait et absence d'effet de l'administration continue de la nicotine et de la cotinine dans l'eau de boisson sur la prise de poids. Les animaux ont été présentés en continu des solutions d'alcaloïde dans l'eau de boisson comme seule source d'eau (imposé) ou avec une autre source d'eau (choix). D'autres groupes ont été traités une nuit et l'alcaloïde retiré une semaine (eau *ad libitum*) puis traités une seconde nuit avec augmentation des doses par 5 et l'alcaloïde retiré. Les animaux ont été pesés à une semaine d'intervalle et les différences de pesée ont été analysées par ANOVA.

Remarquez que le retrait des deux doses de cotinine atteint le seuil de signification de Scheffé.

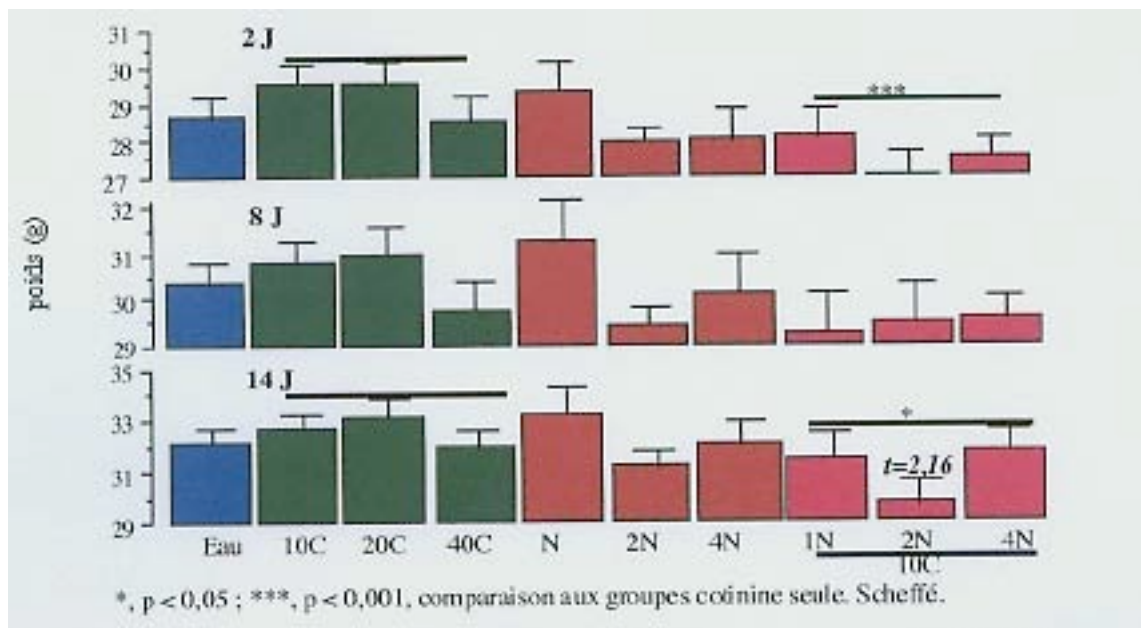
Remarquez la faible prise de poids par le contrôle en accès choix.

Remarquez la régulation de la prise de poids par la nicotine et la cotinine en accès choix.

**B- II- 2- Evolution de la prise de poids** (Fig. 45). À l'inclusion, les variances sont homogènes et la normalité admise. L'examen d'ensemble des données en fonction de la date de pesée et des traitements montre une variance homogène. À l'inclusion, les groupes ont un poids homogène ( $F_{9,90} = 1,55$  ;  $P$ , NS). L'analyse de variance montre un effet très significatif de la date de pesée ( $F_{11,1080} = 194$  ;  $P$ , TS) et des traitements ( $F_{9,1080} = 19,98$  ;  $P$ , TS). Les interactions ne sont pas significatives ( $F_{99,1080} = 0,32$  ;  $P$ , NS). L'effet sur la croissance pondérale entre **J1** et **J2** paraît plus important que sur l'ensemble de l'essai.

## B- MODULATION DE LA PERCEPTION DE LA DOULEUR, DU GAIN DE POIDS ET DE L'ACTIVITE OPENFIELD

## MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON



**Figure 45.** Évolution de la croissance pondérale au cours de l'administration chronique des alcaloïdes dans l'eau de boisson. Les animaux ont été traités comme décrit dans la légende de la Fig. 25 et leur poids suivi par pesée tous les 2-3 jours. Les données ont été traitées comme décrit dans le texte.

Remarquez la singularité de l'évolution et le groupe 2N+10C.

À **J2**. L'analyse de variance montre un effet significatif du traitement ( $F_{9,90} = 2,168$  ;  $P \leq 0,03$ ), les groupes cotinine ont pris plus de poids que les groupes mélanges.

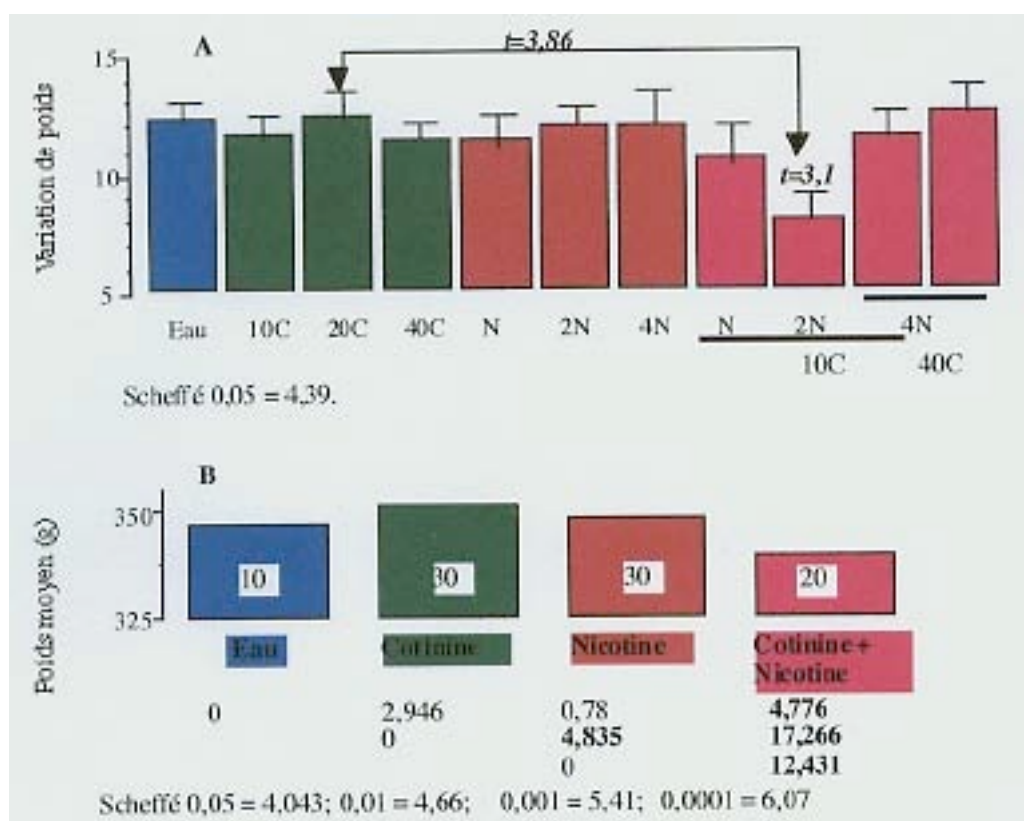
À **J8**. Les différences s'estompent et aucun traitement individuel ou collectif n'affecte significativement la prise de poids.

À **J14**. On retrouve à nouveau une différence entre les groupes cotinine seule et les groupes mélanges. Cependant, la différence est moins forte ( $P \leq 0,05$ ) qu'à **J2** ( $P \leq 0,001$ ). Les autres différences n'ont pas atteint le seuil de signification de Scheffé. Le groupe mélange 2N+10C montre la moindre prise de poids à **J14** ( $t = 2,16$ ) et à **J2** ( $t = 1,73$ ).

**B- II- 3- Effet à la fin du traitement.** L'ANOVA montre un effet significatif du traitement sur la prise de poids en fin de traitement ( $F_{10,96} = 2,552$ ;  $P \leq 0,01$ ). Au seuil de la PPDS ( $S : 1,985$ ), le groupe 20C a pris significativement plus de poids que le groupe 2N+10C et le groupe 2N+10C a pris moins de poids que le reste des groupes (Fig. 46 A).

## B- MODULATION DE LA PERCEPTION DE LA DOULEUR, DU GAIN DE POIDS ET DE L'ACTIVITE OPENFIELD

## MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON



**Figure 46.** Modélisation de l'effet des alcaloïdes sur la prise de poids. Le poids en fin de traitement a été analysé par ANOVA. Remarquez que le shift vers une consommation au choix (Fig. 46 A) ne modifie pas la tendance des effets lors de la consommation imposée (Fig. 45). Pour rendre compte avec précision de l'évolution pondérale au cours de l'ensemble de l'essai, une modélisation linéaire a été réalisée sans prendre en compte le jour 1 pour obtenir un meilleur ajustement comme décrit dans le texte. L'effet n'atteint la signification que pour les mélanges et entre nicotine et cotinine comme indiqué en insert de la Fig. 46 B.

**B- II- 4- Modélisation de la prise de poids.** Pour les dix animaux, les taux de croissance (pentes ou coefficients de régression) sont tous significatifs (Tableau XIII). Une comparaison multiple des dix pentes conduit au rejet de l'hypothèse d'égalité ( $P \leq 10^{-4}$ ). La valeur mise en cause est celle du groupe 2N+10C qui a pris le moins de poids (Fig. 46 A). L'élimination de ce groupe conduit à l'égalité des pentes c'est-à-dire que les droites ajustées sont parallèles confondues ou distinctes. Une analyse de covariance est alors réalisée sans le groupe 2N+10C pour savoir si les pentes sont confondues ou distinctes. L'analyse montre que les droites ne sont

### B- MODULATION DE LA PERCEPTION DE LA DOULEUR, DU GAIN DE POIDS ET DE L'ACTIVITE OPENFIELD



## MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON

pas confondues, c'est-à-dire que l'ordonnée à l'origine ajustée à la pente moyenne ou encore la valeur moyenne des poids totaux des dix animaux de chaque groupe entre **J2** et la fin de l'essai diffèrent significativement. Ce sont ces moyennes que nous avons comparé au lieu de l'ordonnée à l'origine sans grand intérêt (Fig. 46 B).

**Tableau XIII.** Taux de croissance \* (coefficients de régression ou pente) des groupes.

Groupe	b (g/j)	sb	t	p(t)
eau	2,59	0,1151	22,47	4.10 <sup>-9</sup>
10C	2,57	0,0702	36,55	5.10 <sup>-10</sup>
20C	2,85	0,1288	22,11	4.10 <sup>-9</sup>
40C	2,60	0,1032	25,17	2.10 <sup>-9</sup>
N	2,61	0,1719	15,17	2.10 <sup>-7</sup>
2N	3,02	0,1215	24,87	2.10 <sup>-9</sup>
4N	2,86	0,1506	19,02	2.10 <sup>-8</sup>
N+10C	2,67	0,1395	19,125	2.10 <sup>-8</sup>
2N+10C	<b>1,95</b>	0,2068	9,41	6.10 <sup>-6</sup>
4N+10C	2,90	0,1603	18,06	3.10 <sup>-8</sup>

\*, le taux de croissance individuel s'obtient en divisant par 10.

**Conclusion 7** Nous retiendrons que le 2<sup>ème</sup> retrait de la cotinine inhibe la prise de poids alors que l'administration en continu des alcaloïdes n'a pas d'effet. Cependant, les mélanges inhibent la prise de poids. Cette potentialisation n'est linéaire ni par rapport à la dose ni par rapport au temps.

### **B- III- EFFETS SUR L'ACTIVITÉ OPENFIELD**

**B- III- 1- Administration et retrait.** Nous avons analysé les effets sur l'activité openfield à une semaine. Nous avons administré en continue avec une et deux source de solution (eau et

### **B- MODULATION DE LA PERCEPTION DE LA DOULEUR, DU GAIN DE POIDS ET DE L'ACTIVITE OPENFIELD**

## **MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON**

alcaloïde) ou effectué un premier retrait des alcaloïdes, l'eau étant disponible à volonté (Retrait 1). Nous avons également effectué un second retrait des alcaloïdes après avoir augmenté les doses par 5 (retrait 2). Dans ce dernier cas, le retrait 1 sert de ligne de base. Nous avons donc considéré soit l'activité (retrait 1) soit la différence moyenne d'activité (Dm) openfield entre deux sessions (administration continue et retrait 2).

L'analyse descriptive montre que :

**Retrait 2.** La variance est homogène et la normalité est limitée à  $P \leq 0,05$  pour le groupe Eau (ED et AT), N (AE), 0,01C (ME) et 0,1C (ED et AE).

**Administration imposée.** La variance est hétérogène pour le groupe N à  $P \leq 0,05$  (ED) et  $P \leq 0,01$  (AE). La normalité est limitée à  $P \leq 0,05$  pour le groupe eau (ED et AT) et N (AE).

**Administration choix.** La variance est hétérogène à  $P \leq 0,01$  pour le groupe Eau (AT) et N (ED). La normalité est limitée à  $P \leq 0,05$  pour le groupe Eau (M).

L'analyse de variance (ANOVA) a été réalisée, elle montre :

**Retrait 1.** Nous avons analysé les effets du retrait des doses de nicotine (0,4N et N) et de cotinine (0,01C ; 0,1C ; 4C et C) à une semaine après une nuit d'administration avec une seule source.

**Motricité émotionnelle ME.** Les conditions de normalité et d'homogénéité des variances sont remplies. Un effet significatif du traitement mais faible ( $F_{6,70} = 2,82$  ;  $P \leq 0,05$ ). La catégorie nicotine déprime significativement ( $P \leq 0,05$ ) ME contre la combinaison (Eau + C) (Fig. 47).

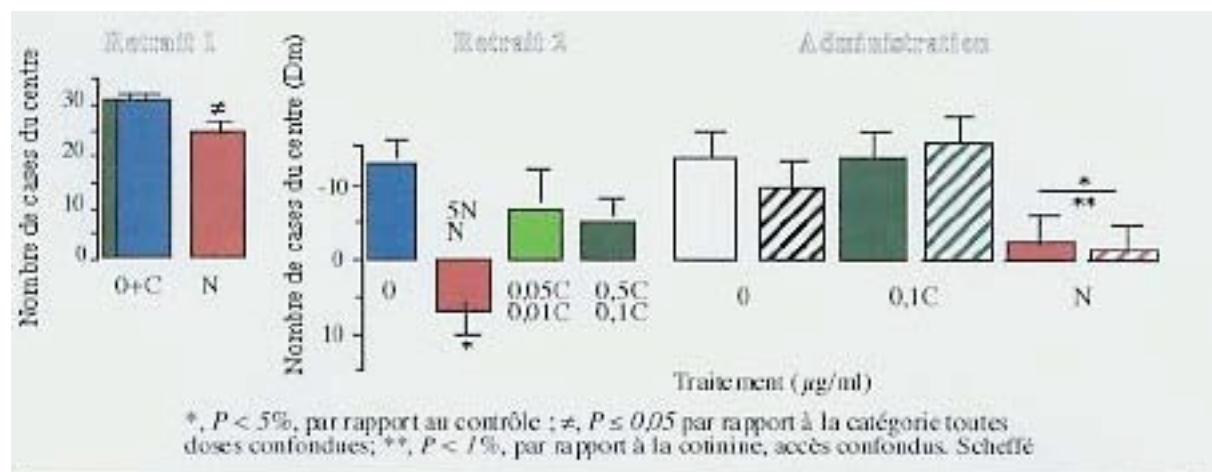
**Motricité M.** Les conditions sont à peu près remplies. Un effet très significatif du traitement ( $F_{6,70} = 11,37$  ;  $P \leq 10^{-8}$ ). La nicotine ( $t = 3,5$  ;  $P \leq 0,01$ ) et la cotinine ( $t = 3,79$  ;  $P \leq 0,01$ ) stimulent la motricité. Les doses de cotinine (0,01C et 0,1C) stimulent ( $P \leq 0,001$ ) la motricité, aucune dose de nicotine n'atteint le seuil de Scheffé (Fig. 48).

**Exploration distale (rearing).** Les conditions sont remplies. Aucun effet significatif.

**Exploration proximale.** Les conditions sont à peu près remplies. Aucun effet significatif.

## **B- MODULATION DE LA PERCEPTION DE LA DOULEUR, DU GAIN DE POIDS ET DE L'ACTIVITE OPENFIELD**

## MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON



**Figure 47.** Modulation de l'activité motrice émotionnelle par l'administration et le retrait des alcaloïdes. Les solutions d'alcaoides ont été présentées comme seule source d'eau (imposé ; symbole plein) ou avec une autre source d'eau (choix ; symbole hachurés). En administration continue, les animaux avaient un accès continu aux solutions et les activités ont été mesurées au jour 1 et au jour 7 d'administration. Lors des retraits, les solutions ont été imposées une seule nuit suivie d'un retrait de 7 jours avant la mesure des activités (retrait 1). Certains groupes ont été à nouveau imposés une nuit les solutions d'alcaoides avec une augmentation de la dose initiale par cinq suivie d'un deuxième retrait d'une semaine avant la deuxième mesure (Retrait 2). Nous avons analysé par ANOVA les activités lors du retrait 1 et la moyenne de la différence d'activité individuelle (Dm) lors de l'administration continue et du retrait 2. Les comparaisons ont été réalisées par le test de Scheffé.

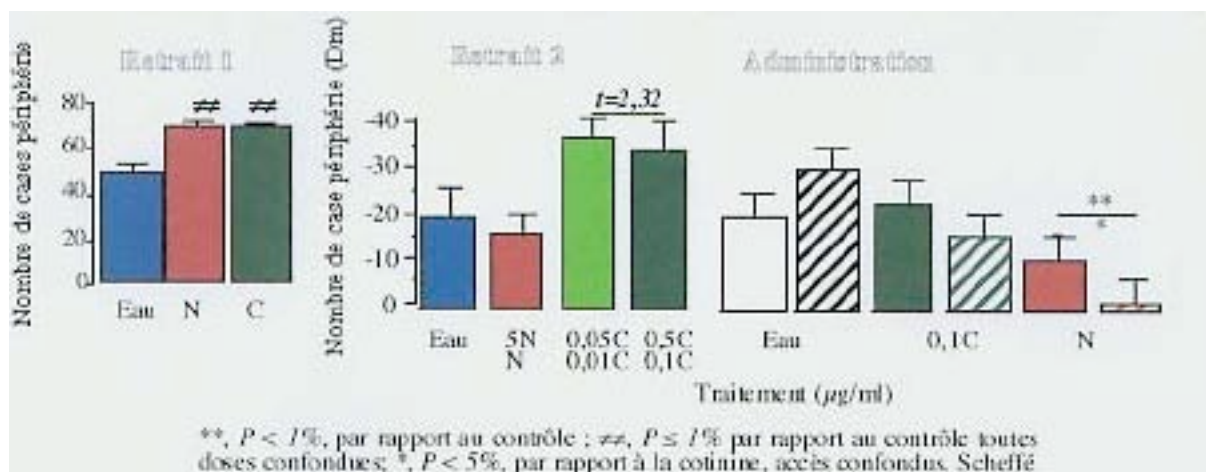
Remarquez l'inhibition par le retrait 1 de la nicotine et la stimulation par son retrait 2 et son administration continue (Scheffé). Les effets de la cotinine n'atteignent pas la signification au seuil de Scheffé.

**Anxiété AT.** Les conditions sont assez mal remplies (variances hétérogènes ;  $P \leq 0,01$  et normalité non vérifiée pour 0,4N ; 0,01C et 0,4C). L'effet est très significatif  $F_{6,70} = 5,83$  ;  $P \leq 6.10^{-5}$ . La dose C stimule ( $P \leq 0,05$ ) l'activité toiletteage (Fig. 51).

**Anxiété AE.** Les conditions sont assez bien remplies. L'effet est très significatif  $F_{6,70} = 2,4$  ;  $P \leq 0,04$ . Aucune catégorie et aucune dose n'a atteint le seuil de signification de Scheffé ( $S = 3,66$ ), mais le test de Student-Newman-Keuls conclut à une différence à 5% entre 0,4N et 0,01C.

### B- MODULATION DE LA PERCEPTION DE LA DOULEUR, DU GAIN DE POIDS ET DE L'ACTIVITE OPENFIELD

## MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON



**Figure 48.** Modulation de l'activité motrice par l'administration et le retrait des alcaloïdes. Les animaux ont été traités comme décrit dans la légende de la Fig. 47. Remarquez la stimulation par le retrait 1 et l'administration continue de la nicotine (Scheffé).

Remarquez la stimulation par le retrait 1 et la dépression par le retrait 2 de la cotinine.

**Administration continue et Retrait 2.** Nous avons analysé les effets de l'administration continue et du retrait 2 à une semaine d'intervalle en considérant les Dm.

**Activité motrice émotionnelle ME.** L'ANOVA montre un effet significatif du retrait ( $F_{3,41} = 4,35$  ;  $P \leq 9.10^{-3}$ ), de l'administration ( $F_{5,54} = 2,81$  ;  $P \leq 0,025$ ), des produits ( $F_{2,54} = 6,63$  ;  $P \leq 0,003$ ) et l'absence d'effet accès 1 / 2 sources ( $F_{1,54} = 0,21$  ;  $P \leq 0,65$ ) et des interactions ( $F_{2,54} = 0,28$  ;  $P \leq 0,76$ ) (Fig. 47).

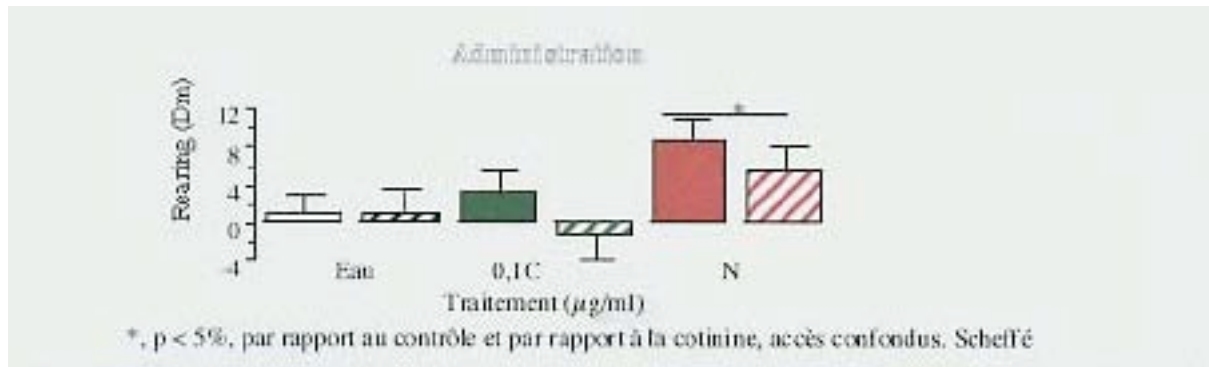
**Activité motrice M.** L'ANOVA montre un effet significatif du retrait 2 ( $F_{3,41} = 3,62$  ;  $P \leq 0,02$ ), de l'administration ( $F_{5,54} = 4,01$  ;  $P \leq 0,004$ ), des produits ( $F_{3,41} = 7,36$  ;  $P \leq 0,01$ ) et l'absence d'effet de l'accès 1 / 2 sources ( $F_{1,54} = 0,51$  ;  $P \leq 0,48$ ) et des interaction ( $F_{2,54} = 2,42$  ;  $P \leq 0,1$ ) (Fig. 48).

**Activité exploration distale ED (rearing).** L'ANOVA ne montre pas d'effet significatif du retrait ( $F_{3,41} = 1,06$  ;  $P \leq 0,4$ ) et de l'administration ( $F_{5,54} = 2,15$  ;  $P \leq 0,07$ ). Elle montre un effet significatif des produits ( $F_{3,41} = 4,18$  ;  $P \leq 0,02$ ) et l'absence d'effet de l'accès 1 / 2 sources ( $F_{1,54} = 1,33$  ;  $P \leq 0,25$ ) et des interaction ( $F_{2,54} = 0,53$  ;  $P \leq 0,59$ ) (Fig. 49).

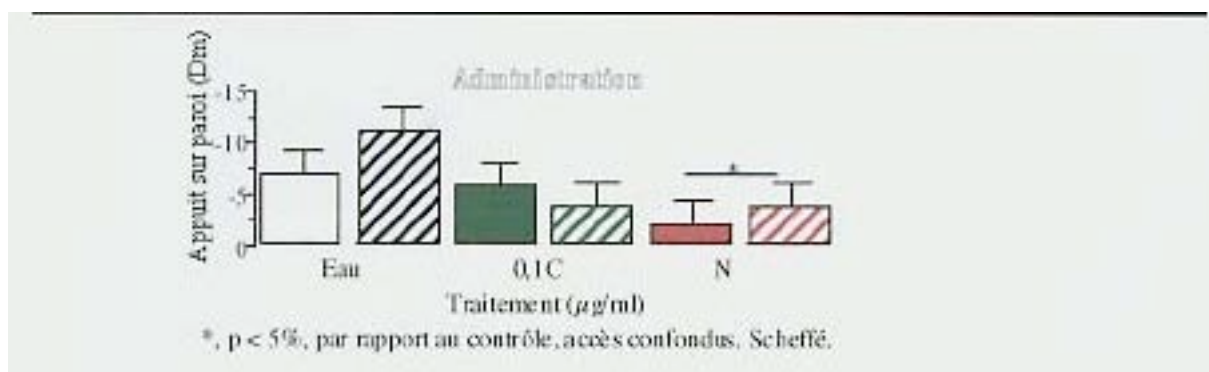
### B- MODULATION DE LA PERCEPTION DE LA DOULEUR, DU GAIN DE POIDS ET DE L'ACTIVITE OPENFIELD

## MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON

Activité exploration proximale. L'ANOVA ne montre pas d'effet significatif du retrait ( $F_{3,41} = 0,4 ; P \leq 0,8$ ), un effet significatif de l'administration ( $F_{5,54} = 2,37 ; P \leq 0,05$ ), des produits



**Figure 49.** Modulation de l'activité exploration distale (rearing) par l'administration et le retrait des alcaloïdes. Les animaux ont été traités comme décrit dans la légende de la Fig. 47. Remarquez que ni le retrait 1 ni le retrait 2 n'affecte cette activité, alors que l'administration continue de la nicotine stimule l'activité.



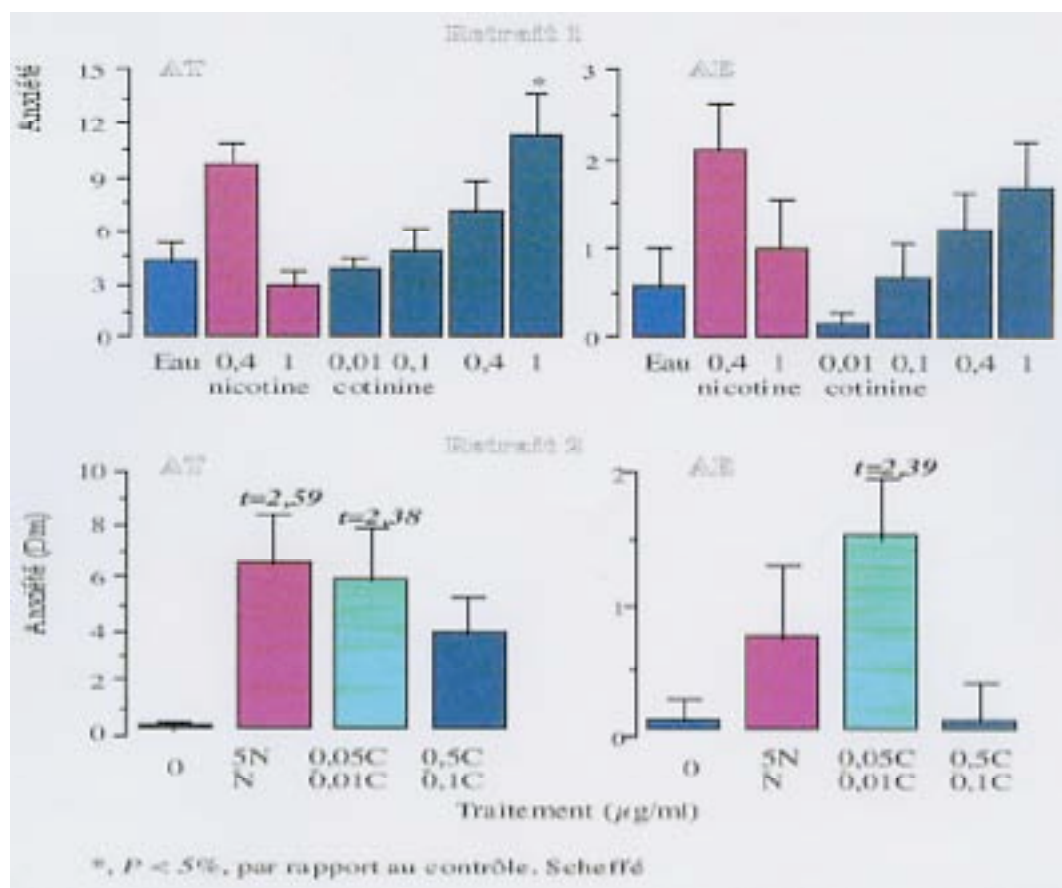
**Figure 50.** Modulation de l'activité exploration proximale par l'administration et le retrait des alcaloïdes. Les animaux ont été traités comme décrit dans la légende de la Fig. 47. Remarquez que ni le retrait 1 ni le retrait 2 n'affecte cette activité, alors que l'administration continue de la nicotine stimule l'activité.

( $F_{3,41} = 4,58 ; P \leq 0,01$ ) et l'absence d'effet de l'accès 1 / 2 sources ( $F_{1,54} = 0,41 ; P \leq 0,52$ ) et des interaction ( $F_{2,54} = 1,15 ; P \leq 0,33$ ) (Fig. 50).

## B- MODULATION DE LA PERCEPTION DE LA DOULEUR, DU GAIN DE POIDS ET DE L'ACTIVITE OPENFIELD

## MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON

**Activité anxiété AT et AE.** L'ANOVA montre un effet proche de la signification du retrait sur l'anxiété AT ( $F_{3,41} = 2,73$  ;  $P \leq 0,06$ ) et significatif sur AE ( $F_{3,41} = 2,77$ ;  $P \leq 0,05$ ). L'effet de l'administration imposé et choix n'est pas significatif (Fig. 51).



**Figure 51.** Modulation des paramètres d'anxiété par l'administration et le retrait des alcaloïdes. Les animaux ont été traités comme décrit dans la légende de la Fig. 47. Remarquez l'évolution similaire des deux paramètres, leur sensibilité différente aux doses, au retrait 1 et 2 et l'absence d'effet de l'administration continue.

**Conclusion 8** Nous retiendrons que l'administration de nicotine stimule les activités ME, M et ED et EP et n'affecte pas l'anxiété. Son retrait 1 déprime ME et stimule M. Son retrait 2 stimule ME. Ses deux retraits stimulent l'anxiété (AT). L'administration de cotinine au 10<sup>ème</sup> de la nicotine n'affecte aucun paramètre, son retrait au 100<sup>ème</sup> stimule l'anxiété. Son retrait 1 stimule, alors que son retrait 2 déprime M. Ces réponses ont des effets doses, des sensibilités aux alcaloïdes et des cinétiques de désensibilisation très différentes.

### B- MODULATION DE LA PERCEPTION DE LA DOULEUR, DU GAIN DE POIDS ET DE L'ACTIVITE OPENFIELD

## **MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON**

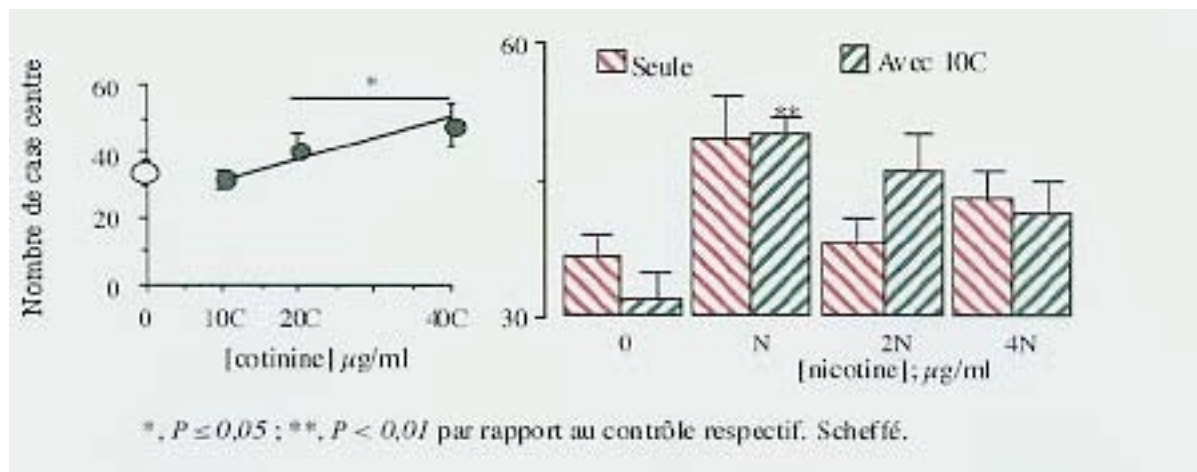
### **B- III- 2- Augmentation des doses et des durées de traitement.**

***Motricité émotionnelle.*** Généralement les distributions sont normales (groupe Eau est limite) et les variances homogènes sauf pour le traitement cotinine. L'analyse de variance montre un effet faible mais significatif ( $F_{3,75} = 3,39$  ;  $P \leq 0,05$ ) de l'administration de cotinine sur l'état moteur émotion (Fig. 52). En considérant la combinaison des doses 20C et 40C ( $t = 2,55$ ), la stimulation de l'effet moteur émotion par la cotinine atteint le seuil de Scheffé ( $S = 2,5$ ). L'effet dépressif de 10C est significatif ( $F_{1,53} = 4,36$  ;  $P \leq 0,05$ ) dans un plan d'analyse additionnel à deux voies avec 3 mesures ( $F_{2,53} = 33,3$ ;  $P$  ;  $TS$ ) (1 = 3 min, 2 = 3 min avec répétition à 4 jours et 3 = 6 min). La cotinine a un effet en deux phases : 10C déprime ME, à plus forte dose, elle stimule. L'analyse de variance montre un effet significatif des traitements ( $F_{7,72} = 3,11$  ;  $P \leq 0,01$ ) et de la nicotine ( $F_{3,72} = 6,13$ ;  $p = 0,01$ ). L'effet de la cotinine et les interactions ne sont pas significatifs. La nicotine N tend à stimuler l'activité motrice émotionnelle ( $t = 2,5$ ) cependant, son influence n'atteint pas le seuil de signification de Scheffé à 5% ( $S = 2,86$ ). En présence de cotinine, la nicotine N ( $t = 3,59$ ) stimule fortement la réponse ( $S = 3,48$  ;  $P < 0,01$ ). La nicotine aux fortes concentrations n'a pas d'effet significatif (Fig. 52).

***Motricité.*** Généralement les distributions sont normales (groupe 40C est limite). Les variances sont homogènes. L'analyse de variance montre un effet significatif ( $F_{3,66} = 4,31$  ;  $P \leq 0,01$ ) de la cotinine sur l'activité motrice à 40C ( $t = 2,62$  ;  $P \leq 0,05$ ) au seuil de Scheffé ( $S = 2,51$ ) en combinant 10C et 20C (Fig. 53). L'effet dépressif de 10C est significatif ( $F_{1,53} = 8,8$  ;  $P \leq 0,01$ ) dans le plan additionnel ( $F_{2,53} = 18,99$  ;  $P$ ,  $TS$ ). La présence de 10C déprime la motricité dans le test 3 ( $t = 2,6$  ;  $P \leq 0,05$ ) et globalement ( $t = 2,97$ ;  $P \leq 0,01$ ). La cotinine a un effet à deux phases : 10C déprime M, à plus fortes doses, elle stimule. L'analyse de variance montre une absence d'effet des traitements ( $F_{7,72} = 0,78$ ) et de la nicotine ( $F_{3,72} = 0,56$ ). L'effet de la cotinine et les interactions ne sont pas significatifs ( $F_{1,72} = 0,1$  et  $F_{3,72} = 1,23$  respectivement) (Fig. 53).

### **B- MODULATION DE LA PERCEPTION DE LA DOULEUR, DU GAIN DE POIDS ET DE L'ACTIVITE OPENFIELD**

## MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON

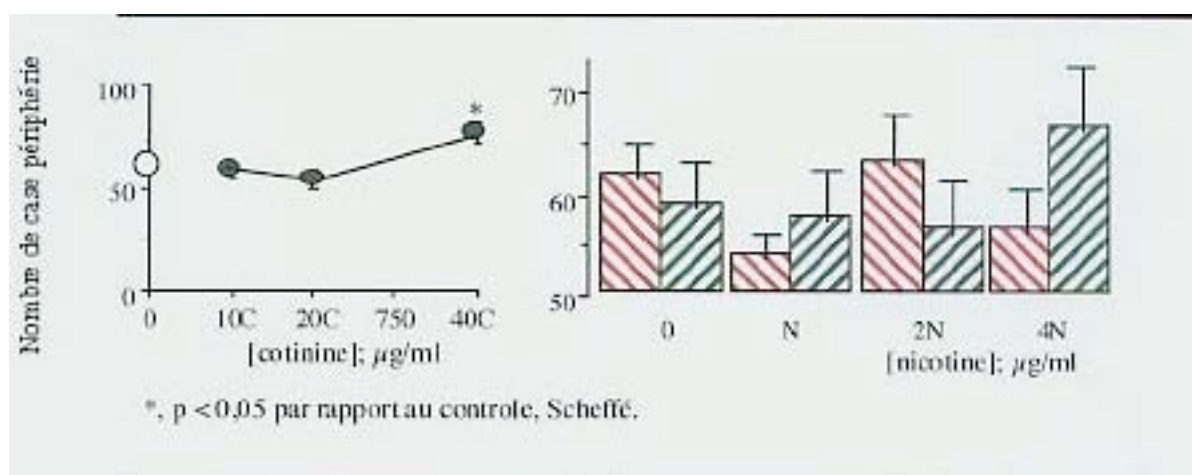


**Figure 52.** Modulation de l'activité motrice émotionnelle par l'administration chronique des fortes doses des alcaloïdes. Les solutions d'alcaoides seuls ou en mélanges ont été présentées comme seule source d'eau (imposé) 14 jours puis avec une autre source d'eau (choix) 14 jours avant la mesure des activités. Nous avons analysé par ANOVA une voie les effets de la cotinine et deux voies les effets de la nicotine seule ou avec la cotinine. Les comparaisons ont été réalisées par le test de Scheffé. Remarquez la désensibilisation de l'effet de la nicotine sur ME, l'effet biphasique de la cotinine sur ME et sa potentialisation de l'effet de la faible dose de nicotine sur ME (Scheffé).

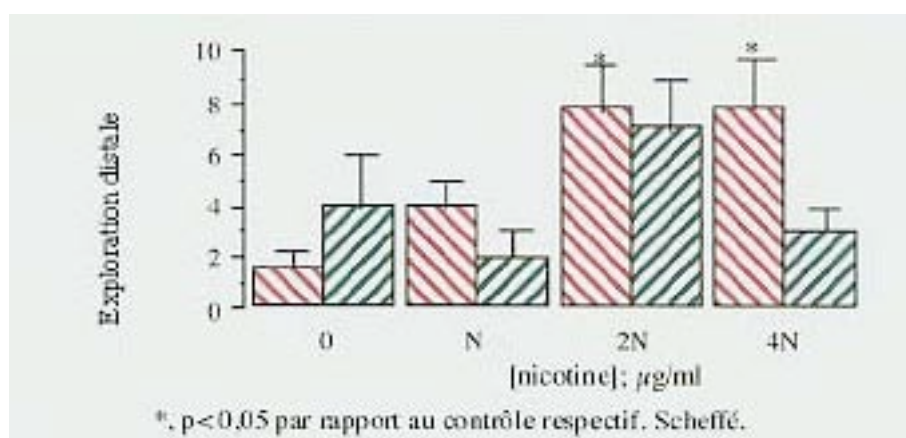
**Rearing.** Généralement les distributions sont normales (groupe 2N est limite) et les variances homogènes. L'analyse de variance ne montre pas d'effet significatif ( $F_{3,68} = 1,23$ ) de la cotinine sur l'activité ED même dans le plan d'analyse additionnel. L'effet est significatif ( $F_{7,72} = 3,14$ ;  $P \leq 0,01$ ) des traitements et de la nicotine ( $F_{3,72} = 4,60$ ;  $P \leq 0,01$ ). Les effets de la cotinine et les interactions ne sont pas significatifs ( $F_{1,72} = 1,56$  et  $F_{3,72} = 2,21$ , respectivement) (Fig. 54).



## MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON



**Figure 53.** Modulation de l'activité motrice par l'administration chronique des fortes doses des alcaloïdes. Les animaux ont été traités et les données ont été analysées comme décrit dans la légende de la Fig. 52. Remarquez la désensibilisation des effets de la nicotine sur M, l'effet biphasique de la cotinine sur M et l'absence d'effet significatif des mélanges (annulation de la dépression induite par la cotinine 10C).



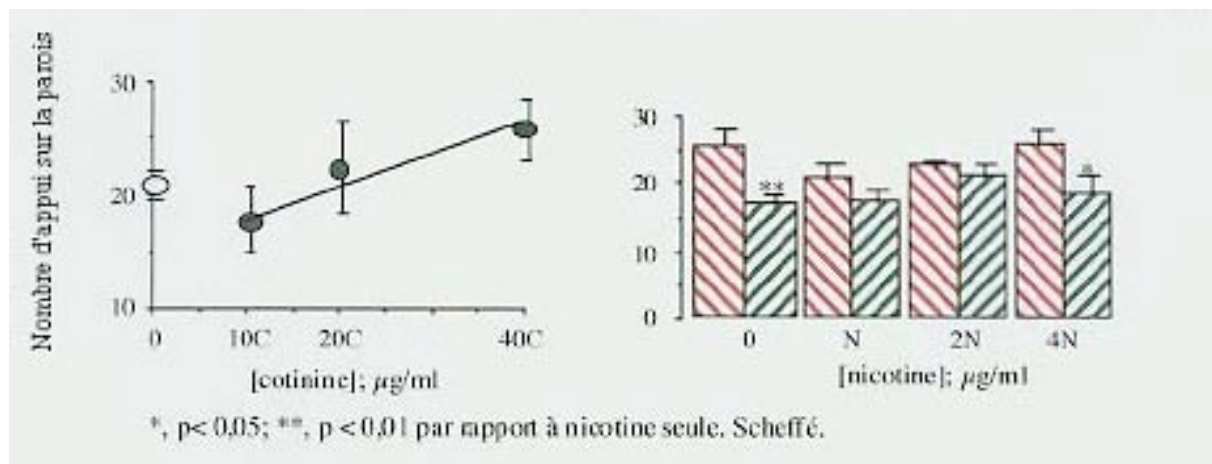
**Figure 54.** Modulation de l'activité exploration distale (rearing) par l'administration chronique des fortes doses des alcaloïdes. Les animaux ont été traités et les données ont été analysées comme décrit dans la légende de la Fig. 52. Remarquez la stimulation du rearing par les fortes doses de nicotine, l'absence d'effet significatif de la cotinine seule sur le rearing et son inhibition des effets des fortes doses de nicotine dans les mélanges.

**Exploration proximale.** Toutes les distributions sont normales et les variances homogènes. L'analyse de variance ne montre pas d'effet significatif ( $F_{3,67} = 1,59$ ) de la cotinine sur l'activité

### **B- MODULATION DE LA PERCEPTION DE LA DOULEUR, DU GAIN DE POIDS ET DE L'ACTIVITE OPENFIELD**

## MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON

EP même dans le plan d'analyse additionnel. L'effet est significatif des traitements ( $F_{7,72} = 2,79$  ;  $P \leq 0,05$ ) et une absence d'effet significatif pour la nicotine ( $F_{3,72} = 0,85$ ). L'effet de la cotinine est très significatif ( $F_{1,72} = 12,59$  ;  $P$ , TS) et les interactions ne sont pas significatives et ( $F_{3,72} = 1,46$ ) (Fig. 55).



**Figure 55.** Modulation de l'activité exploration proximale par l'administration chronique des fortes doses des alcaloïdes. Les animaux ont été traités et les données ont été analysées comme décrit dans la légende de la Fig. 52.

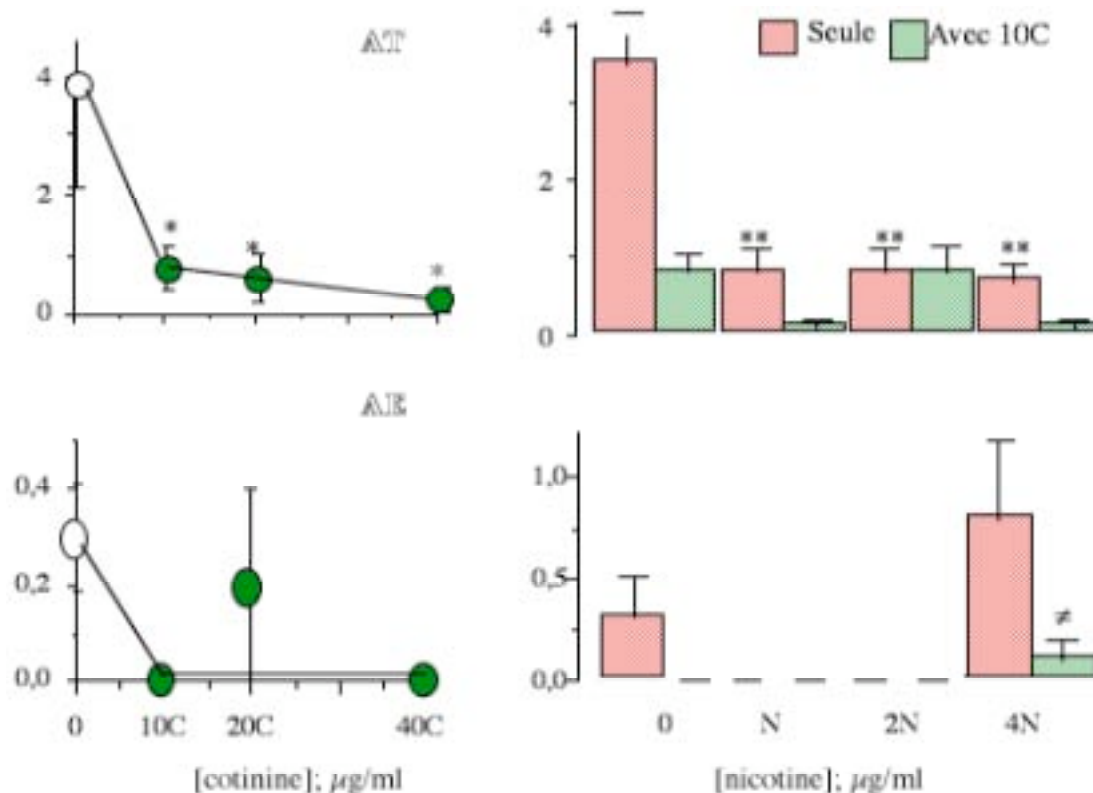
Remarquez la désensibilisation des effets de la nicotine sur l'exploration proximale, l'effet biphasique significatif de la cotinine sur l'exploration proximale lorsqu'elle est seule ou en présence de nicotine dans les mélanges

**Anxiété.** Pour l'activité activité yoilettage (AT), la distribution est normale sauf pour les groupes Eau, 10C et 40C et les variances homogènes sauf pour les groupes mélanges. L'analyse de variance montre un effet significatif ( $F_{3,36} = 5,24$  ;  $P \leq 0,01$ ) de la cotinine sur l'activité AT. L'effet est significatif des traitements ( $F_{7,72} = 4,66$  ;  $P$ , TS), de la nicotine ( $F_{3,72} = 5,41$  ;  $P$ , TS), de la cotinine ( $F_{1,72} = 8,05$  ;  $P$ , TS) et des interactions ( $F_{3,72} = 2,78$  ;  $P \leq 0,05$ ) (Fig. 56 haut). Pour l'activité excréation (AE), la distribution des groupes Eau, N, 2N, et C est limite pour la normalité et les variances ne sont pas homogènes. L'analyse de variance ne montre pas d'effet significatif de la cotinine sur l'activité AE même dans le plan d'analyse additionnel. L'effet des

## B- MODULATION DE LA PERCEPTION DE LA DOULEUR, DU GAIN DE POIDS ET DE L'ACTIVITE OPENFIELD

## MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON

traitements ( $F_{7,72} = 3,1$  ;  $P$ ,  $TS$ ), la nicotine ( $F_{3,72} = 3,48$  ;  $P \leq 0,05$ ) et la cotinine ( $F_{1,72} = 4,84$  ;  $P \leq 0,05$ ) est significatif sur l'activité AE. Les interactions ne sont pas significatives (Fig. 56 bas).



\*,  $P \leq 0,05$ ; \*\*,  $P \leq 0,01$  par rapport au contrôle;  $\neq$ ,  $P \leq 0,01$  par rapport à nicotine seule. Scheffé.

**Figure 56.** Modulation des paramètres d'anxiété par l'administration chronique des fortes doses des alcaloïdes. Les animaux ont été traités et les données ont été analysées comme décrit dans la légende de la Fig. 52. Remarquez la réduction des paramètres d'anxiété par la nicotine et la cotinine lorsqu'elle est seule ou en présence de nicotine dans les mélanges.

**Conclusion 9** Nous retiendrons que l'augmentation des doses et ou de la durée du traitement désensibilise les effets moteurs et émotionnels de la nicotine, ses effets exploratoires désensibilisent en présence de cotinine. Les effets moteurs et émotionnels de la cotinine sont biphasiques : elle déprime à  $\leq 10C$  et stimule à  $\geq 10C$ . Les deux alcaloïdes sont constamment anxiolytiques et montrent des interactions pharmacodynamiques et peut-être pharmacocinétiques ?

## B- MODULATION DE LA PERCEPTION DE LA DOULEUR, DU GAIN DE POIDS ET DE L'ACTIVITE OPENFIELD

# **MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON**

## **DISCUSSION**

Peu de travaux ont été consacrés aux effets de la conversion de la nicotine en cotinine.

Chez l'homme, la cotinine a été rapportée active pour l'aide au sevrage tabagique (Keenan et al., 1994) et sur la mémoire chez le non-fumeur (Herzig et al., 1998). De plus, l'expression forte de CYP 2A6, l'enzyme responsable de la conversion de la nicotine en cotinine, est un facteur de prédiction d'une forte dépendance tabagique (Pianezza et al., 1998). La toxicité de la cotinine est très faible ou inexistante et ses effets subjectifs et cognitifs (Hatsukami et al., 1997) sont affectés par la présence de nicotine (Hatsukami et al., 1998). Chez l'animal de laboratoire, l'étude des effets comportementaux de la cotinine a été limitée à quelques travaux où elle a été administrée surtout en aigu. À notre connaissance, la cotinine n'a jamais été évaluée dans le modèle expérimental d'administration dans l'eau de boisson.

Nos résultats sont en accord avec une étude sur l'activité analgésique des deux alcaloïdes (Erenmemisoglu and Tekol, 1994). Ils montrent qu'ils modulent différemment l'analgésie (Fig. 43), malgré un nombre restreint de doses testées. Ils montrent que l'analgésie de la nicotine augmente avec les doses et la répétition alors que celle de la cotinine augmente plutôt avec la répétition qu'avec les doses (Tableau XII ; Fig. 43). Ces résultats suggèrent que l'activité des deux alcaloïdes passe par des mécanismes différents. La nicotine peut produire une analgésie par les récepteurs nicotiques (Marubio and Changeux, 2000) et la cotinine par ses récepteurs qui sont différents de ceux de la nicotine (Riah et al., 2000). Cette hypothèse est indirectement supportée par l'effet analgésique du ligand cholinergique oxotrémorine (Pavone et al., 1997; Machelska et al., 1999; Przewlocka et al., 1999). Ce ligand lie également les deux sites récepteurs de la cotinine (Riah et al., 2000). Plus intéressant, l'analgésie cholinergique de l'administration intracérébrale et périphérique de l'oxotrémorine (Machelska et al., 1999) est augmentée par les inhibiteurs de la NOS (Pavone et al., 1997; Machelska et al., 1999). Ces résultats suggèrent que la production de NO dans la moelle épinière est pronociceptif. De plus, un inter play entre le système cholinergique et nitriergique semble impliqué dans la modulation de la nociception de longue durée (Przewlocka et al., 1999). Ces résultats indiquent que la voie

## **B- MODULATION DE LA PERCEPTION DE LA DOULEUR, DU GAIN DE POIDS ET DE L'ACTIVITE OPENFIELD**

## **MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON**

arginine-NOS-NO module l'analgésie des drogues cholinergiques et que l'administration des alcaloïdes peut donc moduler l'analgésie.

L'administration continue de doses modérées (Fig. 44 B) et fortes (Fig. 46 B) de cotinine n'a pas d'effet significatif sur la prise de poids. Cependant, elle potentialise l'effet inhibiteur de la nicotine sur la prise de poids (Fig. 46 B). De plus, son administration intrapéritonéale stimule (Riah et al., 1999) alors que son retrait inhibe la prise de poids (Fig. 44 A). Ces résultats indiquent que la cotinine affecte la prise de poids. Cet effet de la cotinine sur la prise de poids parallèle d'autres réponses, comme l'activité émotionnelle (Fig. 48 ; 51), le stress (Riah et al., 1999) et la modulation des récepteurs de la cotinine (Fig. 56-57). Dans l'accès choix, la moindre prise de poids chez le groupe contrôle (Fig. 44 B) confirme que le contexte de nouveauté crée une situation d'apprentissage (Fig. 25) capable d'avoir des répercussions sur la réponse prise de poids. Par ailleurs, le contexte de nouveauté (Rebec et al., 1997), l'apprentissage (Ljungberg et al., 1992), le stress (Kalivas and Stewart, 1991; Kalivas and Duffy, 1995) et l'émotion (Bertolucci-D'Angio et al., 1990) stimulent la libération de la dopamine, le régulateur de la récompense (Chapitre IV). Dans ce contexte, la cotinine régule la prise de poids (Fig. 44 B). Ce résultat confirme qu'elle module la libération de la dopamine (Chapitre IV). Le mécanisme impliqué dans la libération de dopamine a été évalué *in vivo* par microdialyse (Sziraki et al., 1999) et *in vitro* par la pharmacologie et l'immunologie (Chapitre IV). *In vitro*, les résultats confirment que la cotinine stimule la libération de la dopamine par ses récepteurs spécifiques : les anticorps dirigés contre ses récepteurs que nous avons isolés par chromatographie d'affinité (Riah et al., 2000) bloquent l'effet stimulateur de la cotinine sans altérer la libération basale de dopamine (Chapitre IV). *In vivo*, l'administration de 0,5 mg.kg<sup>-1</sup> cotinine inhibe les effets stimulateurs de la nicotine et de la cocaïne sur la libération de dopamine (Sziraki et al., 1999). L'administration de cette dose (11 IP une semaine) down régule les récepteurs de la cotinine (Chapitre III). Ces résultats démontrent que les récepteurs de la cotinine (Chapitre III) du système dopaminergique du mesocorticolimbe (Sziraki et al., 1999) modulent la récompense de la cotinine, de la nicotine et de la cocaïne. Cependant, la cotinine affecte aussi la peroxydation lipidique (Chapitre V-C) et vu le lien étroit entre la peroxydation lipidique et la dopamine

### **B- MODULATION DE LA PERCEPTION DE LA DOULEUR, DU GAIN DE POIDS ET DE L'ACTIVITE OPENFIELD**

## **MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON**

(Sershen et al., 1987; Linert et al., 1999; Kurup and Kurup, 2001; Kumar and Kurup, 2002; Soto-Otero et al., 2002), nos résultats montrent que la libération de dopamine est l'action prime des effets centraux de la cotinine, puisque l'étude cinétique montre que la cotinine n'affecte la peroxydation lipidique qu'au 16<sup>ème</sup> jour d'administration (Chapitre V-C) alors que ses effets moteurs (Fig. 51) et sur la dopamine (Sziraki et al., 1999) peuvent apparaître après une seule administration.

Les effets de la nicotine sur la prise de poids vont eux aussi dépendre de ces paramètres, du régime, de la voie d'administration et du génome considéré. Tantôt elle est inactive (Fig. 44 ; 46) (Rowell et al., 1983), tantôt elle inhibe la prise de poids (Fig. 46 B) (Morgan and Ellison, 1987; Halladay et al., 1999). Dans les expériences homogènes de la présente étude, les résultats montrent que l'administration de la nicotine normalise, comme la cotinine (Fig. 44 B) ou n'a pas d'effet comme la cotinine, (Fig. 46 B) sur la prise de poids. Son retrait après des doses 10-100 fois la cotinine (Fig. 44 A) n'a pas d'effet sur la prise de poids. Ces résultats suggèrent que la réponse prise de poids est down-réglée, car la nicotine a produit suffisamment de cotinine. La moindre prise de poids entre le retrait 1 et 2 de la cotinine (Fig. 44 A) est accompagnée par une dépression motrice significative alors qu'elle n'est pas significative pour la nicotine (Fig. 48). Ces résultats montrent donc un parallèle entre les effets du retrait 1 et 2 sur la motricité et la prise de poids. Plus intéressant, le Retrait 1 de la nicotine et de la cotinine produit une hyperactivité alors que seulement le Retrait 2 de la cotinine déprime l'activité motrice (Fig. 48), en faveur de l'hypothèse de la down-régulation de certaines réponses suivant les doses initiales de nicotine. Ces résultats démontrent que suivant la dose, le retrait des alcaloïdes fini par produire les symptômes de retrait (hyper et hypo activité). L'administration produit des adaptations, comme le montre l'adaptation aux effets de la nicotine et de la cotinine sur tous les paramètres. Ces résultats sont en accord avec les effets comportementaux opposés des deux alcaloïdes (Risner et al., 1985; Goldberg et al., 1989) et leurs effets différents sur la récompense (Fig. 27-28). L'effet des retraits sur la motricité signe, en accord avec le rôle de la dopamine dans la récompense (Wise, 1996; Berridge and Robinson, 1998; Ikemoto and Panksepp, 1999) et l'homéostasie hédoniste (Koob and Le Moal, 1997), le développement de la dépendance aux

### **B- MODULATION DE LA PERCEPTION DE LA DOULEUR, DU GAIN DE POIDS ET DE L'ACTIVITE OPENFIELD**

## **MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON**

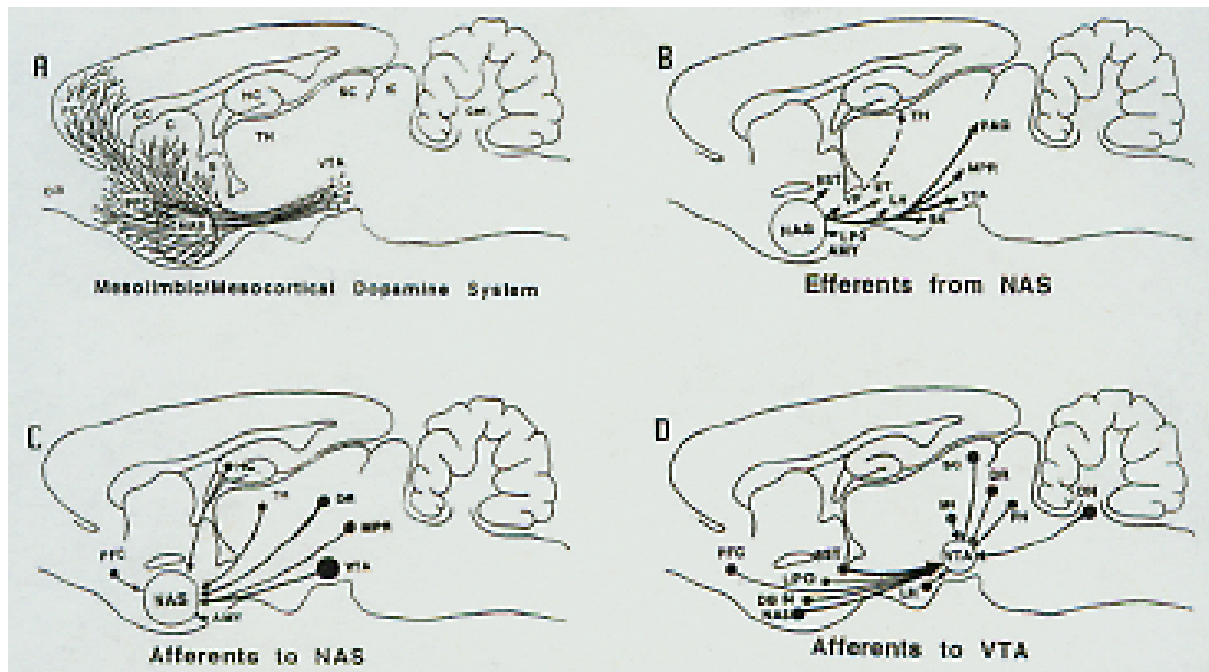
alcaloïdes. Cette hypothèse est confortée par l'augmentation constante des réponses d'anxiété lors des retraits 1 et 2 (Fig. 51). En accord avec l'hypothèse des doses des alcaloïdes, l'administration de cotinine n'affecte pas l'anxiété dans le test plus maze (Brioni et al., 1993). Cependant, le NO (Reddy and Kulkarni, 1998) et la corticostérone (Heinrichs et al., 1992) sont anxiogènes et le stress modifie les fonctions de la voie L-arginine-NOS-NO et les effets comportementaux des antagonistes NOS (Pokk and Vali, 2002). Ces résultats montrent que suivant l'état du stress et les doses, les effets anxiolytiques et ou anxiogènes des alcaloïdes vont ou ne vont pas faire surface.

D'un côté, nous avons trouvé les doses de cotinine pour affecter l'hyperactivité (Fig. 48) et l'anxiété (Fig. 51) lors de son retrait. De l'autre côté, nous avons trouvé les doses de nicotine pour affecter l'émotion (Fig. 47), la motricité (Fig. 48) et l'exploration (Fig. 49-50) lors de son administration. Enfin, nous avons trouvé les doses dans les mélanges pour montrer des interactions pharmacodynamiques entre ces deux alcaloïdes (Fig. 46 ; 52 ; 54-56). L'augmentation des doses et de la durée du traitement a révélé surtout l'effet biphasique de la cotinine, qui déprime puis stimule l'émotion (Fig. 52) et la motricité (Fig. 53), et la désensibilisation des effets de la nicotine. Cependant, les effets anxiogènes et ou anxiolytiques sont communs aux deux alcaloïdes et pourrait être lié aux effets sur les espèces réactives de l'oxygène et ou du nitrogène, donc un stress oxydant, et ou sur la libération de la dopamine donc aussi bien physiologique et comportementale.

Finalement, l'étude présente a été orientée vers la contribution de la cotinine aux effets de la nicotine. Pour cela, les doses des alcaloïdes des mélanges et les plans expérimentaux ont été planifiés de manière à répondre à ce besoin. Les résultats obtenus montrent que la cotinine ne va pas contribuer aux effets directs de l'administration de la nicotine sauf à certaines doses où les interactions pharmacodynamiques et pharmacocinétiques sont possibles. Les effets du retrait indirect de la cotinine sont en accord avec l'hypothèse de l'activation de récepteurs liés aux mécanismes de la récompense illustrés ci-dessous (Fig. 57).

## **B- MODULATION DE LA PERCEPTION DE LA DOULEUR, DU GAIN DE POIDS ET DE L'ACTIVITE OPENFIELD**

## MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON



**Figure 57.** Illustration du cerveau de rat, montrant le nucleus accumbens septi du système meso-corticolimbe (A), ses efférents (B), afférents (C) et les afférent du VTA. Abréviations : AMY, amygdala ; BST, bed nucleus of striata terminalis ; C, caudate-putamen ; CC, corpus callosum ; DB, diagonal band of Broca ; DN, dentate nucleus ; DR, dorsal raphe ; ET, Entopeduncular nucleus ; FC, frontal cortex ; HC, hippocampus ; IC, inferior colliculus ; LH, lateral hypothalamus ; LPO, lateral preoptic area ; MPR, mesopontine reticular nuclei ; OB, olfactory bulb ; PAG, periaqueductal gray ; PFC, prefrontal cortex ; PN, parabrachial nucleus ; SC, superior colliculus ; SI, substantia innominata ; SN, substantia nigra ; TH, thalamus ; VP, ventral pallidum.

### B- MODULATION DE LA PERCEPTION DE LA DOULEUR, DU GAIN DE POIDS ET DE L'ACTIVITE OPENFIELD



**MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT  
DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON**

**CHAPITRE V. MÉCANISMES ET EFFETS DE  
L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET  
DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON**

# **MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON**

## **ABSTRACT**

Tobacco smoke affect the homeostatic regulation of reactive species of oxygen and nitrogen with bad consequences on health and economic in the word. In the present study, we have evaluated effects of nicotine and cotinine administration from drinking water on lipid peroxydation. We have also evaluated the expression of cotinine receptors, cloning strategy and the contribution of endothelium to cotinine vasodilatation activity.

The results showed that nicotine and cotinine affect with long-term potentiation and depression lipid peroxydation. Effects of nicotine should result from its conversion to cotinine and from its intrinsic pro-oxidant activity, while those of cotinine from regulation of nitrogen reactive species. Consistent with these results, cotinine vasodilatation activity is partially, while that of acetylcholine is totally, dependent on endothelium. Cotinine receptors are homologous of proteins implicated in inflammatory process and paracrine stimulation of cell growth and are found in tissues and human cell lines of neuronal and non-neuronal type. In rat brain, increase gradient from anterior to posterior is observed and in cells in culture their expression increase from day 1 to day 3, then decrease. Cotinine administrations in doses that normalize lipid peroxydation statues regulate four proteins from which we have cloned two, one unknown and the other the product of the gene 2,19. The two others should be p40H, which is down regulated by cotinine administration, and p40L, which is resistant to cotinine administration.

We propose that cotinine affect, through p40, nitrogen and oxygen reactive species statues.

**Key Words:** nicotine and cotinine; lipid peroxydation; expression and cloning of cotinine receptors; vasodilatation; reactive species of oxygen and nitrogen.

# **MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON**

## **RÉSUMÉ**

Le tabagisme affecte l'homéostasie des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote avec des conséquences lourdes sur la santé et l'économie mondiale. Dans la présente étude, nous avons évalué les effets de l'administration dans l'eau de boisson de la nicotine et de la cotinine sur la peroxydation lipidique. Nous avons également évalué l'expression des récepteurs de la cotinine, les stratégies de clonage et la contribution de l'endothélium à l'activité vasodilatatrice de la cotinine.

Les résultats obtenus montrent que la nicotine et la cotinine affectent la peroxydation lipidique avec potentialisation et dépression à long terme. Les effets de la nicotine seraient liés à sa conversion en cotinine et à son activité pro-oxydante intrinsèque, alors que ceux de la cotinine à la régulation des espèces réactives du nitrogène. En accord avec ces résultats, l'activité vasodilatatrice de la cotinine est partiellement, alors que celle de l'acétylcholine est totalement, dépendante de l'endothélium. Les récepteurs de la cotinine sont homologues de protéines impliquées dans l'inflammation et la stimulation paracrine de la croissance cellulaire et sont exprimés dans les tissus et cellules humaines de type neuronales et non neuronales. Dans le cerveau de rat, un gradient antéro-postérieur croissant est observé et dans les cellules en culture, leur expression augmente de J1 à J3 de culture puis baisse. L'administration de la cotinine aux doses qui normalisent le statut de la peroxydation lipidique, régule 4 protéines dont nous avons cloné deux, l'une inconnue et l'autre le produit du gène 2,19. Les deux autres protéines seraient la p40H, down régulée par l'administration de la cotinine, et la p40L, résistante à l'administration de la cotinine. Nous proposons que la cotinine affecte, via la p40, le statut des espèces réactives de l'oxygène et du nitrogène.

**Mots Clés :** nicotine et cotinine ; peroxydation lipidique ; expression et clonage des récepteurs de la cotinine ; vasodilatation ; espèces réactives de l'oxygène et du nitrogène.

# **MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON**

## **INTRODUCTION**

La cigarette a été identifiée comme le seul plus important facteur de l'athérosclérose périphérique et de l'anomalie de la relaxation des veines, des artères et de l'aorte (Chalon et al., 2000). Les maladies cardiaques sont la cause principale de la mort aux USA (Van Gilder et al., 1997) et les pays développés (Orth et al., 2001). La combustion du tabac produit environ mille composés chimiques dans la phase gaz et particule de la fumée, qui ont des effets aigus ou chroniques sur le système cardiovasculaire (Su et al., 1998). Le challenge serait d'identifier lequel composé est pathologique et de caractériser son action. Parmi ces composés, la nicotine a été la plus étudiée en raison de son rôle dans la dépendance tabagique (Henningfield and Goldberg, 1983). La nicotine est mitogène sur les cellules du muscle lisse et endothéliales en culture et elle est toxique sur ces cellules à fortes doses (Carty et al., 1996; Carty et al., 1997). La cigarette induit des changements morphologiques dans la cellule endothéliale et la nicotine altère l'expression, par la cellule endothéliale, d'un ensemble de protéines comme la fibronectine, le facteur VIII/vWF, le facteur de croissance basique ( $\beta$ FGF), de transformation ( $TGF\beta 1$ ), l'endotheline (Kuo et al., 1989; Su et al., 1998) et la monoxyde d'azote (NO) synthase (Conklin et al., 2001).

En plus des effets de la cigarette et de la nicotine, les fumeurs sont continuellement imprégnés par le dérivé majeur de la nicotine, la cotinine (Benowitz et al., 1983). Les effets hémodynamiques de la cotinine sont connus depuis très longtemps (Borzelleca et al., 1962; Benowitz and Sharp, 1989; Smith et al., 1994). La cotinine stimule également la synthèse de la prostacycline (Chahine et al., 1990), affecte la transmission noradrenergique du cœur (Chahine et al., 1993) et module les effets cardiovasculaires de la nicotine (Chahine et al., 1996). La cotinine est plus mitogène que la nicotine sur la cellule humaine du muscle lisse (Carty et al., 1997) et détériore plus que la nicotine la fonction de la cellule endothéliale par un mécanisme différent de celui de la nicotine dans la carotide et les artères coronaires (Conklin et al., 2001). D'autres effets de la cotinine sont également différents, car ils ne sont pas bloqués par les antagonistes des récepteurs de la nicotine (Goldberg et al., 1989; Riah et al., 1999), de

# **MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON**

l'histamine, de l'adrénaline (Borzelleca et al., 1962; Smith et al., 1994) et de la muscarine (Borzelleca et al., 1962). Par conséquent, la cotinine agit par des mécanismes non-cholinergiques, non-adrénergiques et non-histaminiques comme le confirme le séquençage aminoacide de son récepteur nouveau (Riah et al., 2000). Le challenge serait donc d'identifier lequel des deux alcaloïdes nicotine ou cotinine a le prime rôle dans les conséquences sur la santé de la dépendance tabagique ? C'est à cette question que nous tenterons de répondre, du moins en partie, par l'étude de la modulation de la peroxydation lipidique, l'activité de relaxation de type EDRF et l'expression des récepteurs de la cotinine.

## **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

Les effets de l'administration de la nicotine et de la cotinine sur la peroxydation lipidique ont été étudiés chez la souris *Mus musculus*. Les alcaloïdes ont été mis en solution fraîche tous les soirs dans l'eau de boisson et présentés *ad libitum* comme seule source d'eau (imposé) ou avec la possibilité de choisir entre l'alcaloïde et l'eau (choix) comme il a été décrit précédemment. Dans tous les cas le groupe eau sert de contrôle. Les animaux ont été sacrifiés dans une enceinte à CO<sub>2</sub>, conservés à -20°C, les tissus prélevés et extraits dans le méthanol grade HPLC à 4°C, à raison de 5 ml par g sauf pour le cœur et le poumon 10 ml par g. La peroxydation lipidique a été quantifiée par la méthode FOX modifiée (Hermes-lima et al., 1995). L'activité de relaxation de l'aorte a été mesurée sur des anneaux d'aorte de lapin de 2-3 mm pré-contractés avec l'adrénaline. La relaxation a été mesurée en présence et en absence de l'endothélium pour estimer la contribution de l'endothélium à la relaxation par la formule  $100 \times [(\% \text{ relaxation avec endothélium} - \% \text{ relaxation sans endothélium}) / (\% \text{ relaxation avec endothélium})]$  (Furchgott and Zawadzki, 1980; Vanhoutte, 1989; Binko et al., 1998; Wassmann et al., 2002). L'expression des récepteurs de la cotinine a été étudiée comme décrit (Chapitre III). Le clonage des récepteurs de la cotinine a été effectué par deux approches : l'approche par la réaction de polymérisation en

# **MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON**

chaîne (PCR) d'amorces nucléotides dégénérées. Les amorces ont été désignées à partir des séquences aminoacide des peptides des récepteurs de 40 kDa. Dans ce cas, nous avons criblé une banque d'ADNc de cerveau de rat que nous avons synthétisé grâce à un Kit reverse transcription (PHARMACIA BIOTECH) ou une banque d'expression dans Lambda gt11 non orientée de cerveau de rat commerciale (CLONETECH). Nous avons également effectué un criblage immunologique de la banque Lambda gt11 et d'une banque de cellules de l'épiderme humain dans ZAP-express synthétisée au laboratoire grâce à un Kit de clonage (STRATAGENE). Les anticorps ont été produits chez la souris par des injections répétées dans le muscle des protéines isolées par chromatographie d'affinité. Le séquençage des acides nucléiques a été réalisé manuellement ou sur des automates dans le laboratoire ou dans des services de séquençage du CNRS ou privés.

Les séquences obtenues ont été comparées à celles des banques de données. La validité des clones obtenus par PCR a été jugée par l'obtention d'une séquence codant le peptide que nous avons cherché à amplifier. La validité des clones isolés des banques d'expression par criblage immunologique a été jugée par l'obtention d'une protéine dont l'expression est modulée par l'administration de la cotinine. Dans ce cas, la modulation de la protéine a été étudiée par Western blot grâce à son anticorps mono spécifique. L'anticorps mono spécifique a été isolé du sérum par deux tours successifs d'adsorption sur filtres de nitrocellulose. Le premier filtre est saturé avec le phage vide et le second filtre est saturé avec le clone isolé. Les effets sur la peroxydation lipidique ont été soumis à une analyse de variance (ANOVA), après estimation de la normalité par le test de David (E/S) et de l'égalité des variances par le test de Cochran ( $S_{i_{\max}}^2 / \sum (S_i^2)$ ). Les comparaisons ont été faites au seuil de Scheffé ( $S^2\alpha = (k-1)F_{k-1; n-1; \alpha}$ , où k est le nombre de groupe à comparer).

# **MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON**

## **RÉSULTATS**

### **C- I- EFFETS SUR LA PEROXYDATION LIPIDIQUE**

#### **C- I- 1- Analyse globale des effets sur la peroxydation lipidique**

*Dans le cerveau* : la variabilité entre individus est significative ( $F_{4,10} = 8,35 ; P \leq 0,003$ ), nous utiliserons les réplifications pour obtenir la valeur moyenne de chaque individu. Il existe un effet significatif faible du traitement ( $F_{22,72} = 1,8 ; P \leq 0,033$ ) sur la peroxydation lipidique.

*Dans le cœur* : la variabilité entre individus n'est pas significative ( $F_{2,6} = 1,79 ; P \leq 0,25$ ), nous utiliserons les réplifications pour chaque individu. Il existe un effet du traitement très significatif ( $F_{22,195} = 101 ; P \leq 4.10^{-94}$ ) sur la peroxydation lipidique.

*Dans le poumon* : la variabilité entre individus est très significative ( $F_{2,6} = 11,21 ; P \leq 0,01$ ), nous utiliserons les réplifications pour obtenir la valeur moyenne de chaque individu. Il existe un effet significatif fort du traitement ( $F_{22,49} = 11,49 ; P, TS$ ) sur la peroxydation lipidique.

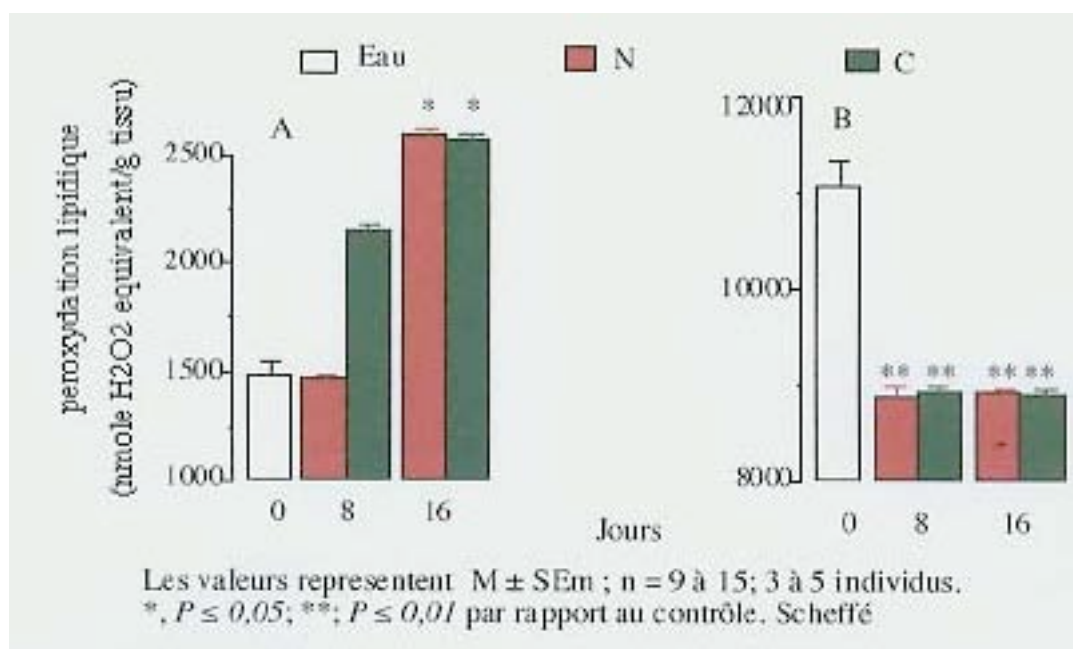
*Dans le rein* : la variabilité entre individus n'est pas significative ( $F_{2,6} = 2,95 ; P, NS$ ), nous utiliserons les réplifications pour chaque individu. Il existe un effet significatif fort du traitement ( $F_{22,196} = 5,96 ; P, TS$ ) sur la peroxydation lipidique.

*Dans le foie* : la variabilité entre individus n'est pas significative ( $F_{2,6} = 1,55 ; P, NS$ ), nous utiliserons les réplifications pour chaque individu. Il existe un effet significatif fort du traitement ( $F_{22,196} = 6,08 ; P, TS$ ) sur la peroxydation lipidique.

#### **C- I- 2- Analyse de la cinétique des effets sur la peroxydation lipidique**

*Administration* L'étude cinétique montre un effet significatif du traitement sur l'évolution de la peroxydation lipidique dans le cerveau ( $F_{12,32} = 5 ; P \leq 0,0001$ ) et le cœur ( $F_{12,116} = 13 ; P \leq 16.10^{-15}$ ). L'administration de N et C stimule dans le cerveau et déprime dans le cœur la peroxydation lipidique (Fig. 58).

## MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON

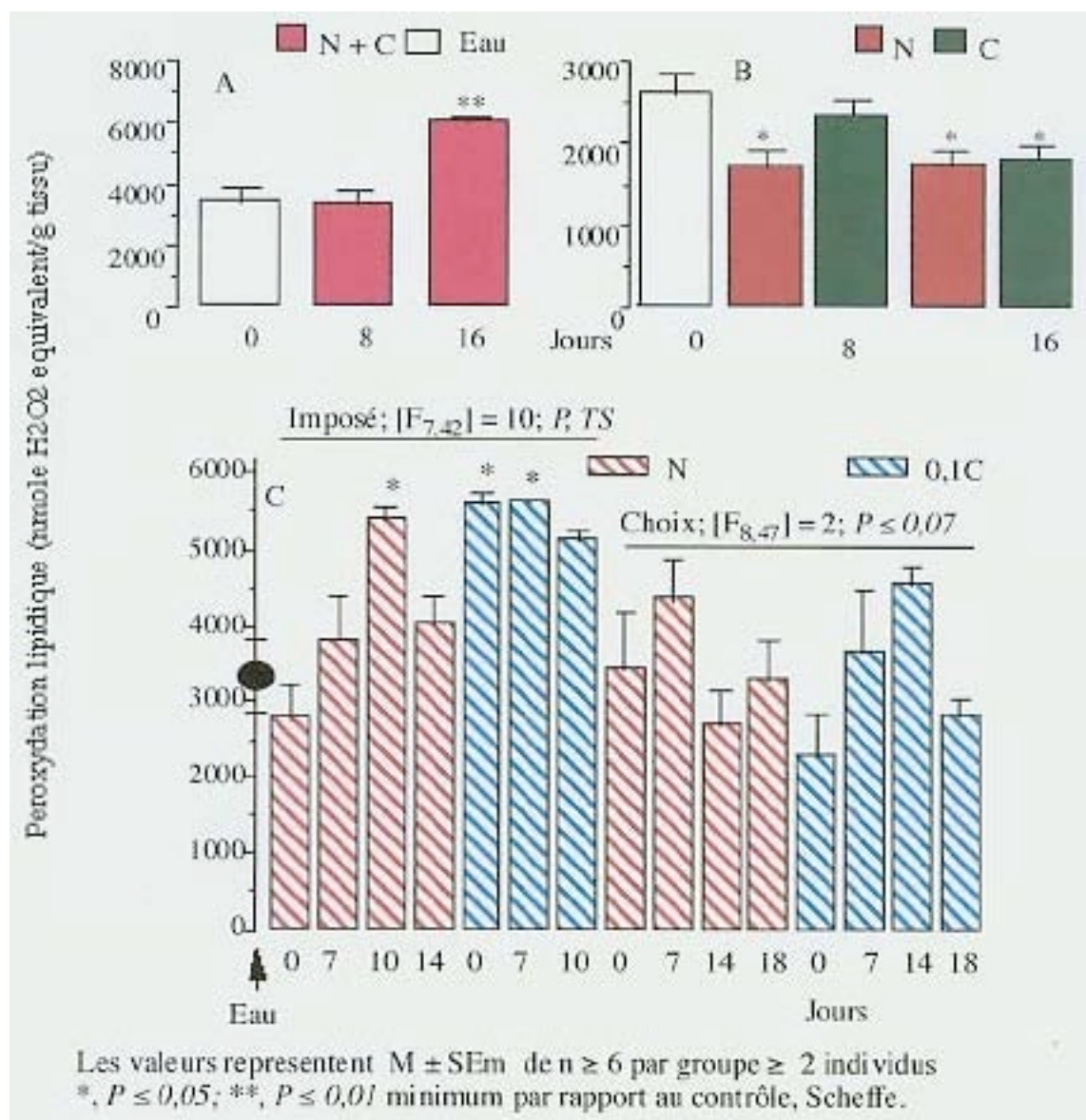


**Figure 58.** Cinétique de la modulation de la peroxydation lipidique par l'administration de la nicotine et de la cotinine dans l'eau de boisson. Les animaux ont été traités comme décrit dans la légende de la Fig. 40. Ils ont été sacrifiés aux temps indiqués dans une enceinte à CO<sub>2</sub>, stockés à -20 et la peroxydation lipidique tissulaire a été déterminée par la formation du complexe Fe(III)-xylenol orange selon le protocole de Hermes-Lima et al., (Hermes-lima et al., 1995). Les données ont été analysées par AVOVA comme décrit dans le texte. Remarquez l'effet rapide, mais non significatif, de l'administration de la cotinine dans le cerveau (A) et l'action identique dès 8 jours de l'administration des deux alcaloïdes dans le cœur (B).

L'étude cinétique ne montre pas d'effet significatif du traitement sur l'évolution de la peroxydation lipidique dans le poumon ( $F_{12,30} = 1,6$ ;  $P \leq 0,14$ ). L'effet est significatif dans le rein ( $F_{12,115} = 6,06$ ;  $P \leq 39.10^{-7}$ ) et le foie ( $F_{12,116} = 7,99$ ;  $P \leq 99.10^{-10}$ ). L'administration de N et de C stimule la peroxydation lipidique dans le rein au jour 16 en combinant les deux alcaloïdes (Fig. 59 A). L'administration de N déprime la peroxydation lipidique dans le foie dès le jour 8, l'administration de C atteint la signification au jour 16 (Fig. 59 B).



## MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON



**Figure 59.** Cinétique de la modulation de la peroxydation lipidique par l'administration de la nicotine et de la cotinine dans l'eau de boisson dans le rein (A) et dans le foie (B) et par le retrait des alcaloïdes dans le rein (C). Les animaux ont été traités et les données analysées, comme décrit dans la légende de la Fig. 58. Remarquez la signification de l'effet stimulateur de N et C dans le rein (A) et la rapidité de la dépression par N dans le foie (B). Remarquez le retrait de 1N et de 0,1C stimule dans le rein (C) la peroxydation lipidique, mais seulement lorsque les alcaloïdes étaient imposés initialement. Notez que le jour J0 de retrait correspond à un mois d'administration.

# MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON

**Retrait** Le retrait a été effectué après un mois d'administration imposé ou au choix. La cotinine a été administrée à une concentration 10 fois inférieure à celle de la nicotine (Tableau XIV). Au jour 0 de retrait correspondant à un mois d'administration, l'effet des alcaloïdes sur la peroxydation lipidique est significatif ou devient significatif au cours des jours de retrait (Fig. 59 C).

**Tableau XIV.** Évolution de la peroxydation lipidique <sup>(a)</sup> au cours du retrait des alcaloïdes après un mois d'administration dans l'eau de boisson dans cinq tissus de la souris <sup>(b)</sup>.

Retrait (J) / Traitement 30 J	0	7-10	14	18	Tissu contrôle <sup>(c)</sup>
Nicotine N	2193 ± 50 <sup>(*)</sup> 2200 ± 62 <sup>(d)</sup>		1983 ± 173 <sup>(*)</sup> 2265 ± 78		Cerveau 1554 ± 229
Cotinine 0,1C	2132 ± 78	2014 ± 210	2208 ± 69 <sup>(*)</sup> 2151 ± 87		
Nicotine N	10175 ± 62	9384 ± 170 <sup>(*)</sup>	10182 ± 69	9947 ± 119	Cœur 11069 ± 284
Cotinine 0,1C	9733 ± 119 <sup>(*)</sup>	9678 ± 118 <sup>(*)</sup>	9962 ± 258	9956 ± 241	
Nicotine N	4407 ± 402	4046 ± 136	3286 ± 247	3880 ± 291	Poumon <sup>(e)</sup> 4338 ± 536
Cotinine 0,1C	3605 ± 321	3426 ± 193	3426 ± 193	3239 ± 381	
Nicotine N	4409 ± 467 <sup>(*)</sup> 4364 ± 296		4016 ± 449	3295 ± 524	Foie 2616 ± 230
Cotinine 0,1C	3394 ± 579	4707 ± 339 <sup>(*)</sup> 4593 ± 201		2817 ± 252	

<sup>(a)</sup>, la peroxydation lipidique tissulaire a été évaluée par le protocole de Hermes-Lima et al., (Hermes-lima et al., 1995).

<sup>(b)</sup>, moyenne ± SEM des valeurs en accès libre et imposé.

<sup>(c)</sup>, pour le rein voir Fig. 59 C.

<sup>(d)</sup>, les cases fusionnées indiquent que la moyenne de la combinaison accès et des jours a été utilisée.

<sup>(e)</sup>, pour le poumon un effet du retrait globalement significatif ( $P \leq 0,05$ ) a été observé.

<sup>(\*)</sup>, les valeurs sont significativement différentes du contrôle ( $P \leq 0,05$  ; minimum Scheffé).

# MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON

On retrouve l'évolution observée lors de l'administration sauf pour le foie (Tableau XIV).

Une stimulation de la peroxydation lipidique dans le cerveau (Tableau XIV) et le rein (Fig. 59 C) et une dépression de la peroxydation lipidique dans le cœur (Tableau XIV).

Le poumon montre une dépression significative ( $P \leq 0,05$ ) de la peroxydation lipidique.

Le foie passe d'une dépression (Fig. 59 B) à une stimulation (Tableau XIV).

À un mois d'administration, la dose 0,1C est suffisante pour moduler la peroxydation lipidique.

Une analyse de variance (bloc : Produit x Jour x accès) montre que l'état de la peroxydation lipidique ne change pas au cours du retrait dans le cerveau, le poumon, le cœur et le foie. Au contraire, dans le rein l'état de la peroxydation lipidique évolue lors retrait des alcaloïdes ( $F_{7,40} = 3$  ;  $P \leq 0,01$ ). Les effets jour ( $F_{3,40} = 4$  ;  $P \leq 0,05$ ) et les interactions Jour x Accès ( $F_{3,40} = 4$  ;  $P \leq 0,05$ ) sur la peroxydation lipidique sont significatifs (Fig. 59 C). En accès libre, l'état de la peroxydation lipidique n'évolue pas significativement ( $F_{8,47} = 2$  ;  $P$ , NS). En accès imposé, l'état de la peroxydation lipidique évolue significativement ( $F_{8,47} = 10$  ;  $P$ , TS).

À un mois, l'effet de 1N n'est pas significatif (Fig. 59 C), alors qu'il l'était à 16 jours (Fig. 59 A).

L'effet de 1C est significatif à 16 jours (Fig. 58 A) et celui de 0,1C est significatif à un mois (Fig. 59 C).

Au cours des jours de retrait, la peroxydation lipidique est stimulée (Fig. 59 C).

**Conclusion 10** Nous retiendrons que l'administration des alcaloïdes aux doses équivalentes (N ou C) affecte la peroxydation lipidique de manière tissu spécifique : une stimulation dans le cerveau et le rein et une dépression dans le cœur, le poumon et le foie. La cotinine est plus rapide que la nicotine à produire l'effet central. À un mois, les effets de 0,1C ou de 1N qui éventuellement avaient désensibilisé sont sensibilisés à nouveau par le retrait des alcaloïdes. Ces résultats soulignent que la peroxydation lipidique a un caractère de potentialisation de type LTP et LTD (potentialisation et dépression à long terme). Ces effets, du moins ceux de la cotinine qui n'a pas d'activité pro-oxydante intrinsèque *in vitro* (Gouazé et al., 1998), indiquent l'activation

## C- DIT NO À LA COTININE

## MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON

secondaire de messenger du stress oxydant ROS et ou RNS (espèces réactives de l'oxygène et du nitrogène).

**C- I- 3- Effet des fortes doses et longues durées de traitement sur la peroxydation lipidique** (Fig. 60). Dans les expériences suivantes, la peroxydation lipidique a été mesurée après deux jours de substitution (voir légende de la Fig. 25 et Fig. 33). L'analyse de variance montre :

**Poumon.** Aucun effet significatif des traitements ( $F_{8,18} = 0,06$  ;  $P$ , NS).

**Cerveau.** Un effet significatif sur la peroxydation lipidique si on combine toutes les doses du pré traitement au sein d'une même catégorie ( $F_{3,51} = 5,12$  ;  $P \leq 0,01$ ). Les animaux prétraités un mois par la nicotine ( $t = 3,42$  ;  $P \leq 0,05$ ) et le mélange ( $t = 2,95$  ;  $P \leq 0,05$ ) ont un taux de peroxydation lipidique plus élevé. Ceux qui ont été prétraités un mois par la cotinine ont un taux de peroxydation lipidique normal ( $t = 1,62$  ;  $P$ , NS). La régression linéaire n'est pas significative et la déviation est significative pour les pré-traitement nicotine ( $P$ , TS) et les mélanges ( $P \leq 0,01$ ) (Fig. 60 A).

**Foie.** Aucun effet significatif sur la peroxydation lipidique dans les pré-traitement cotinine ( $F_{3,32} = 0,52$  ;  $P$ , NS) et mélanges ( $F_{4,40} = 2,39$  ;  $P$ , NS). La peroxydation lipidique est élevée dans les pré-traitement nicotine ( $F_{3,32} = 5,93$  ;  $P$ , TS). La régression ( $F_{1,2} = 12,87$  ;  $P$ , NS) n'est pas significative (Fig. 60 B).

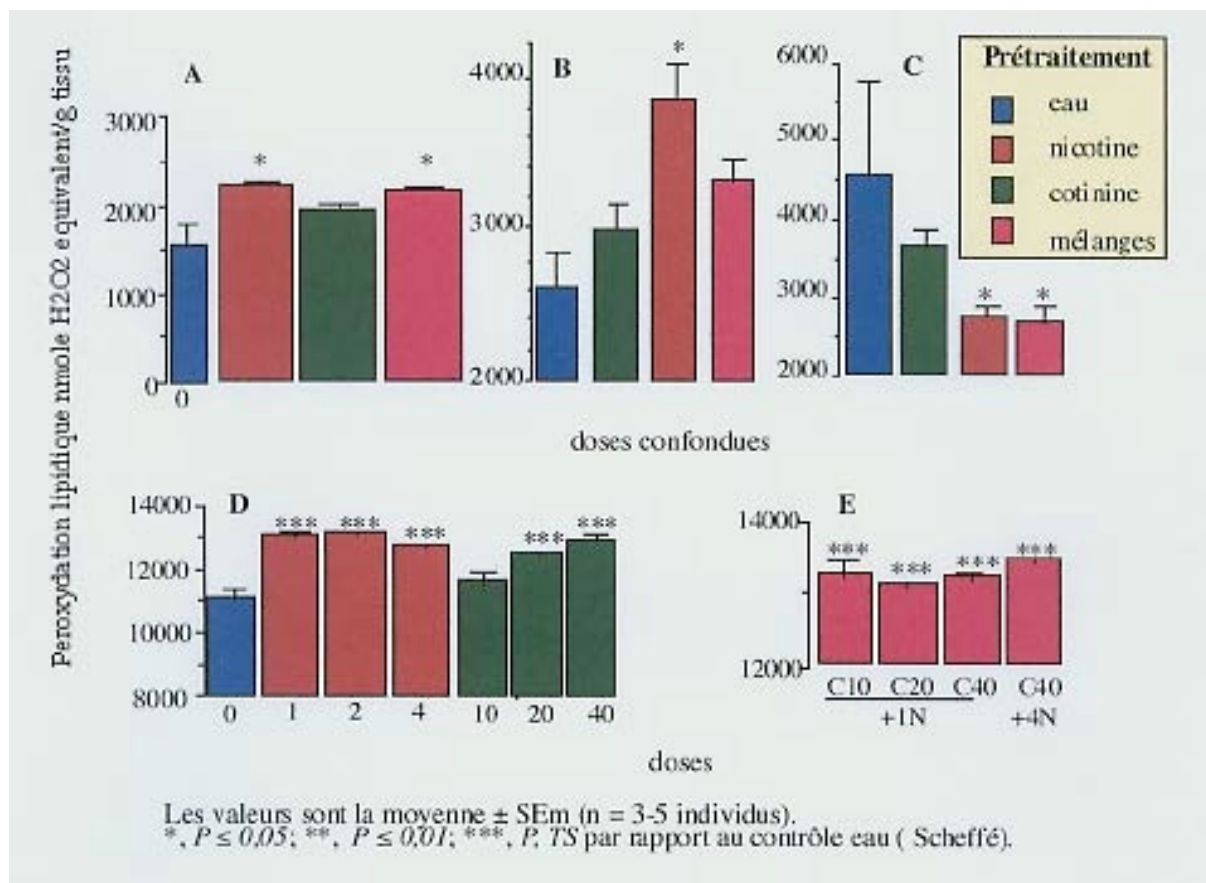
**Rein.** Un effet significatif sur la peroxydation lipidique si on combine toutes les doses de pré-traitement au sein d'une même catégorie ( $F_{3,95} = 41$  ;  $P$ , TS). Les animaux prétraités à la nicotine ( $t = 3,25$  ;  $P \leq 0,05$ ) et les mélanges ( $t = 3,49$  ;  $P \leq 0,05$ ) ont un taux de peroxydation lipidique élevé mais aucun traitement ne donne une régression linéaire (Fig. 60 C). La peroxydation lipidique est normale dans les prétraités à la cotinine (Fig. 60 C).

**Cœur.** Les animaux prétraités à la cotinine ( $F_{3,32} = 12$  ;  $P$ , TS), nicotine ( $F_{3,32} = 26$  ;  $P$ , TS) et mélanges ( $F_{4,40} = 33$  ;  $P$ , TS) ont un taux de peroxydation lipidique significativement plus élevé

### C- DIT NO À LA COTININE

## MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON

(Fig. 60 D). La régression linéaire est significative pour le pré-traitement cotinine ( $F_{1,2} = 28$  ;  $P$ ,  $TS$ ) uniquement. La déviation de la régression est significative pour le pré-traitement nicotine ( $F_{2,32} = 32$  ;  $P$ ,  $TS$ ) (Fig. 60 D) et mélanges ( $F_{3,40} = 26$  ;  $P$ ,  $TS$ ) (Fig. 60 E).



**Figure 60.** Effet à long terme de l'administration des fortes doses des alcaloïdes dans l'eau de boisson sur la peroxydation lipidique. Les solutions d'alcaloïdes ont été présentées 14 jours comme seule source d'eau puis 14 jours avec une autre source d'eau et enfin les doses de nicotine ont été substituées par une seule dose de cotinine pendant deux jours et vice versa comme décrit dans la légende de la légende de la Fig. 25. La consommation des alcaloïdes au cours des deux jours de substitution est visible sur la Fig. 34. Ils ont été sacrifiés et la peroxydation lipidique évaluée dans les tissus du cerveau (Fig. 60 A), du foie (Fig. 60 B), du rein (Fig. 60 C) et du cœur (Fig. 60 D et E), comme décrit dans la légende de la Fig. 58.

## MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON

Remarquez que les valeurs de la peroxydation lipidique ne diffèrent pas significativement de celles du contrôle, sauf dans le cœur (Fig. 60 D), dans tous les tissus des animaux prétraités par la cotinine.

Remarquez que les valeurs de la peroxydation lipidique diffèrent significativement de celles du contrôle dans tous les tissus des animaux prétraités à la nicotine.

Remarquez que les valeurs de la peroxydation lipidique sont passées d'une inhibition (Fig. 58 B) à une stimulation (Fig. 60 D) dans le cœur, de la stimulation (Fig. 59 A) à l'inhibition (Fig. 60 C) dans le rein et de l'inhibition (Fig. 59 B) à la stimulation (Fig. 60 B) dans le foie.

Remarquez l'absence de linéarité des effets de doses de nicotine dans le pré traitement et la linéarité, au moins dans le cœur, de ceux de la cotinine.

Remarquez que le pré traitement par les mélanges ressemble au pré traitement par la nicotine dans tous les tissus sauf dans le foie où il ressemble à celui de la cotinine.

**Conclusion 11** Nous retiendrons que la substitution des doses de la nicotine (1N-4N) par la cotinine 10C et de la cotinine (10C-40C) par la nicotine 1N n'a pas les mêmes conséquences sur la peroxydation lipidique. La substitution par la cotinine affecte la peroxydation lipidique, alors que la substitution par la nicotine n'a pas d'effet. De plus, la linéarité n'est observée que pour les doses de pré traitement par la cotinine. Les inversions observées dans le cœur et le foie (les dépressions remplacées par des stimulations) et le rein (la stimulation remplacée par une dépression) seraient liées aux fortes doses de cotinine. Ces résultats indiquent *qu'in vivo* la cotinine 10C régule la peroxydation lipidique. Le métabolisme de la nicotine 1N à 4N va générer des doses de cotinine  $\leq 3C$  (70 %) actives sur la peroxydation lipidique. Enfin, la nicotine n'est pas seulement une pro-drogue vis-à-vis de la peroxydation lipidique, à moins de considérer son activité pro-oxydante intrinsèque (Gouazé et al., 1998).

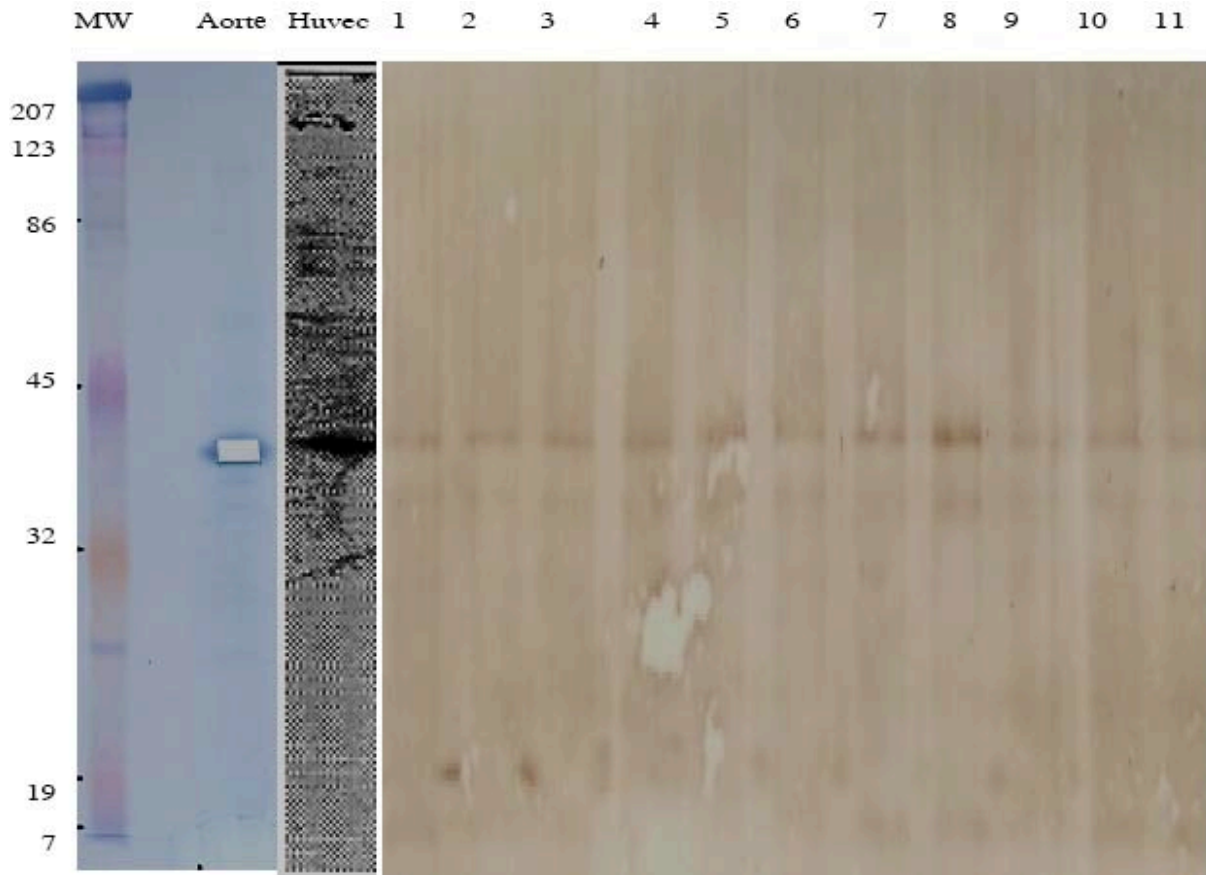
# **MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON**

## **C- II- EFFETS SUR LA RELAXATION DE L'AORTE : ACTIVITÉ EDRF/NO ET EXPRESSION DES RÉCEPTEURS DE LA COTININE**

*Expression des récepteurs de la cotinine* nous avons identifié dans le cerveau de rat par une méthode de radiorécepteur que nous avons développé pour la première fois (Riah et al., 2000) les récepteurs de la cotinine. Nous avons également isolé par une méthode de chromatographie d'affinité que nous avons mise au point (Riah et al., 2000) un complexe de récepteurs de la cotinine ou CRC. Du complexe CRC nous avons purifié une première protéine de 40 kDa haute ou p40H (High) puis, une seconde protéine de 40 kDa basse ou p40L (Low), dont la proportion relative est affectée par le stress de la manipulation de l'animal par l'injection saline (Chapitre III). Nous avons montré l'identité de la séquence aminoacide NH<sub>2</sub> terminale des deux protéines de 40 kDa ou les p40s. Les p40s sont les homologues des protéines humaines avec une séquence DINGGG rapportées dans d'autres études (Hain et al., 1996; Bush et al., 1998). Cette homologie de séquence entre les p40s et les protéines DINGGG suggère des rôles très importants à la cotinine. En effet, les protéines humaines DINGGG ont un rôle dans les réactions inflammatoires du rein (Binette and Binette, 1994), la polyarthrite rhumatoïde (Hain et al., 1996) et la stimulation paracrine de la croissance des fibroblastes et de certaines lignées tumorales (Bush et al., 1998). En accord avec ces travaux, nous avons isolé une p40 de l'aorte de Lapin ayant la séquence aminoacide NH<sub>2</sub> terminale DINGGGATLPQ identique à celle de la p40 du cerveau de rat (Fig. 61). Nous avons également produit chez la souris les anticorps de CRC pour étudier, par Western blot, l'expression et la régulation et pour cloner, par criblage immunologique des banques d'expression, les récepteurs de la cotinine. Les p40s sont exprimées par les cellules humaines non neuronales HUVEC (Human Umbilical Vascular Endothelial Cells) (Fig. 61), HT29, CACO 2, la fraction membranaire (Fig. 61 ; piste 4) et cytosolique (Fig. 61 ; piste 5) des cellules neuronales NBE (Fig. 61 ; piste 3) et par les cellules de l'épiderme humain sain (Fig. 61 ; piste 1 et 2). De plus, en phase de croissance exponentielle on observe une sur-expression de la p40 dans les cellules neuronales NBE (Fig. 61 ; pistes 6-8) et non neuronales HUVEC (non montré) suivie d'une sous-expression (Fig. 61 ; piste 9-11).

## **C- DIT NO À LA COTININE**

# MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON

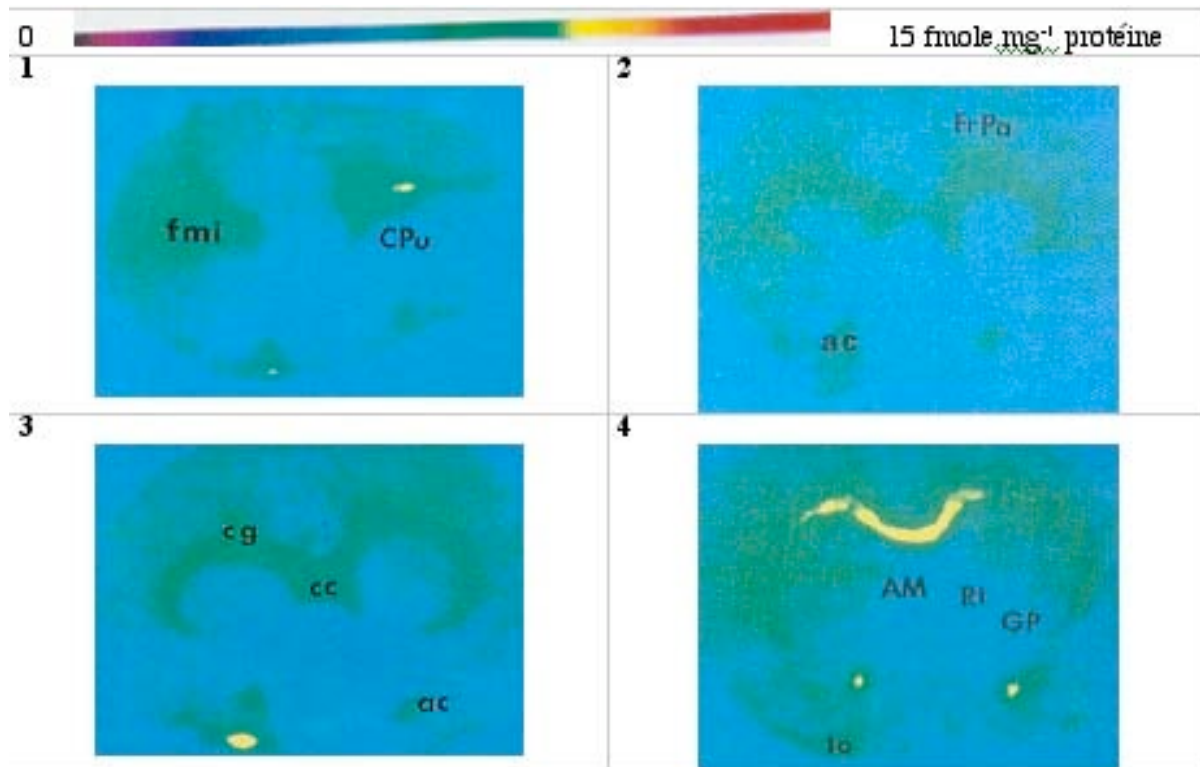


**Figure 61.** Purification de la p40 de l'aorte et étude de son expression par Western blot dans les lignées et tissus humains. Le complexe des récepteurs de la cotinine (CRC) a été isolé par chromatographie d'affinité de l'aorte de Lapin comme décrit pour celui du cerveau de rat (Riah et al., 2000). Une p40 a été purifiée par électrophorèse sur gel SDS-PAGE et sa séquence aminoacide NH2 terminale DINGGGATLPQ est identique à celle de la p40 du cerveau de rat. Nous avons immunisé la souris avec CRC et obtenu un sérum immun capable de reconnaître la p40 dans les préparations des tissus humains comme l'épiderme (piste 1 = 1  $\mu$ g protéine et 2 0,1  $\mu$ g protéine), les lignées non neuronales comme les HUVEC (1  $\mu$ g tissu) et neuronales comme les NBE (piste 3-11 ; 1  $\mu$ g tissu). Les conditions de culture des cellules étaient standard. La fraction NP40 de l'épiderme humain est un don généreux du Dr. Marina Weber. Remarquez l'augmentation de l'expression de la p40 dans les cellules NBE (piste 6-8) puis la répression après le 3<sup>ème</sup> jour de culture (piste 9-11). Ce paterne d'expression a également été observé dans les cellules HUVEC mais de manière plus accentuée.



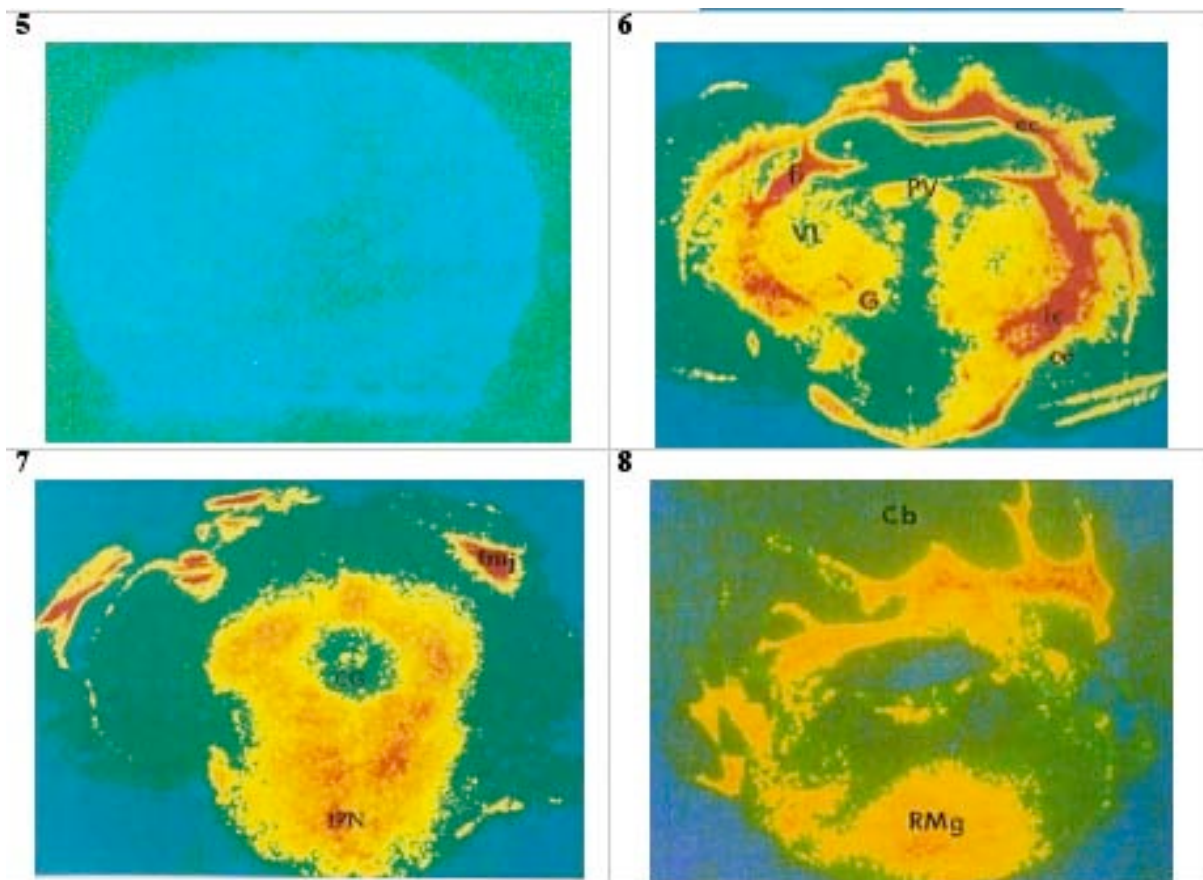
# MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON

Dans le cerveau de rat, les récepteurs de la cotinine sont exprimés, entre autres, dans le système limbique avec un gradient rostro-caudale croissant (Fig. 62).



**Figure 62.** Image auto-radiographique montrant un gradient d'expression rostro-caudale des récepteurs de la cotinine dans le cerveau de rat. Des coupes (10  $\mu$ m) de cerveau de rat ont été obtenues au microtome, incubées avec la [125I]cotinine (0,2 nM), lavées, séchées, mise sous film Kodak X-OMAT- AR, en présence d'un étalon de quantification de 0 (bleu) à 15 (rouge) fmole.mg<sup>-1</sup> protéine (Microscales ; Amersham). Les images couleurs ont été obtenues par une conversion arbitraire du niveau de gris dans le logiciel Biocom comme décrit (Riah, 1996). Remarquez le gradient d'expression antéro-postérieur croissant (du jaune au rouge) des récepteurs de la cotinine. Remarquez le marquage du corps calleux et des commissures antérieures qui, normalement, ne sont pas marqués par la nicotine tritiée et l'alpha-bungarotoxine iodée (Riah, 1996).

# MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON

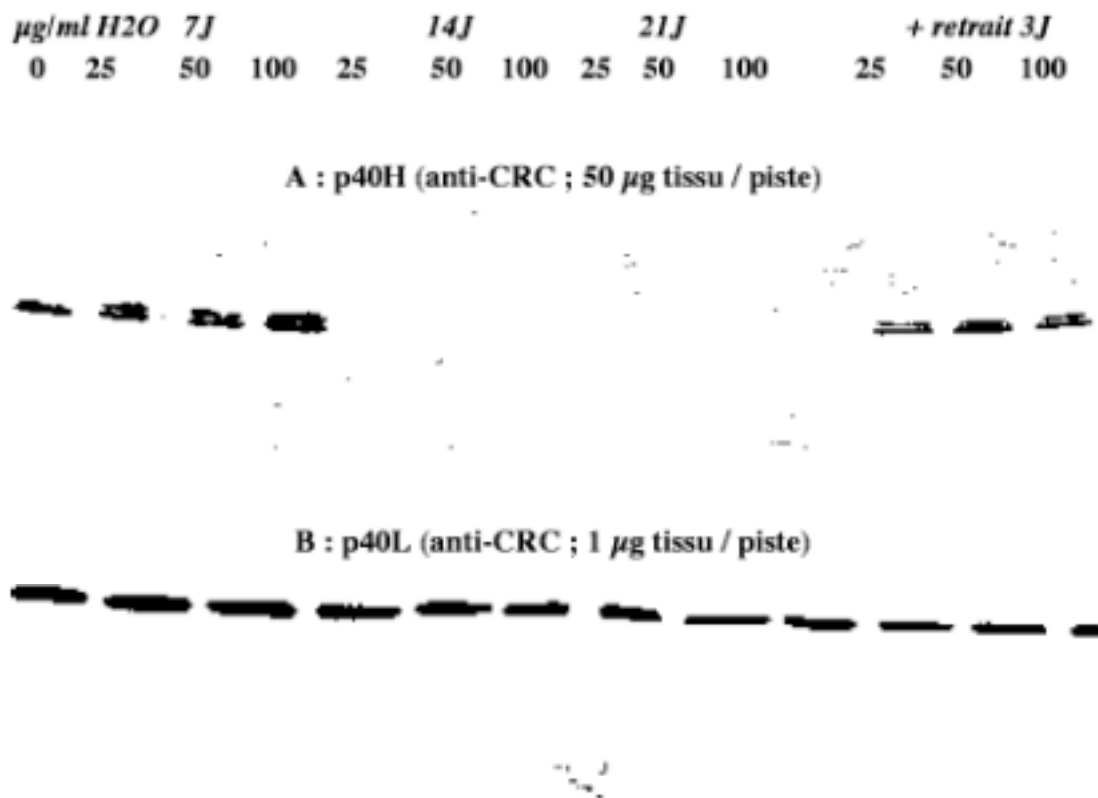


Les coupes sériées 1 à 8 traduisent le sens rostro-caudal, la coupe 5 a servi à la liaison non spécifique en présence de mM cotinine.

Légende : ac, commissures antérieures; Acg, cortex cingulate antérieur; AHP, aire antérieure hypothalamique; Arc, noyau arcuate hypothalamique; BL, noyau basolatéral amygdaloïde; BM, noyau amygdaloïde basomédial; CA, zone des cornes d'Ammon de l'hippocampe; cc, corps calleux; Ce, noyau central amygdaloïde; CG, substance grise centrale; CPu, caudate-putamen; DA, aire hypothalamique dorsale; DG, dentate gyrus; DLG, noyau geniculate dorsolatéral; DM, noyau dorso-médial hypothalamique; ec, capsule externe; En, noyau endopiriforme; Fi, fimbria de l'hippocampe; fmj, forceps majeur du corps calleux; FrPa, cortex fronto-pariétal; Hi, Hippocampe; G, noyau thalamique gelatinosus; ic, capsule interne; LM, noyau mamillaire latéral; LP, noyau thalamique posterolatéral; LS, noyau septal latéral; Me, noyau amygdaloïde médial; MG, noyau geniculate médial; mt, tract mammillothalamique; Pco, noyau amygdaloïde cortical postérieur; PMCo, noyau amygdaloïde corticoposteromédial; PT, noyau thalamique paraténial; PV, noyau thalamique paraventriculaire; Re, noyau thalamique reuniens; Rt, noyau thalamique reticular; SuG, couche grise superficielle du collicule supérieur; VL, noyau thalamique ventrolatéral; VLG, noyau geniculate ventro-latéral; VM, noyau ventrolatéral hypothalamique; VPM, partie médiale du noyau thalamique posteroventral.

## MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON

L'administration IP de la cotinine down régule (baisse d'expression) la p40H et n'a pas d'effet sur la forme p40 résistante (p40L) (Riah et al., 2000). L'administration de la cotinine dans l'eau de boisson down régule également l'expression de la p40H (Fig. 63 ; 65) et n'a pas d'effet sur la p40L (Fig. 63 ; 65).

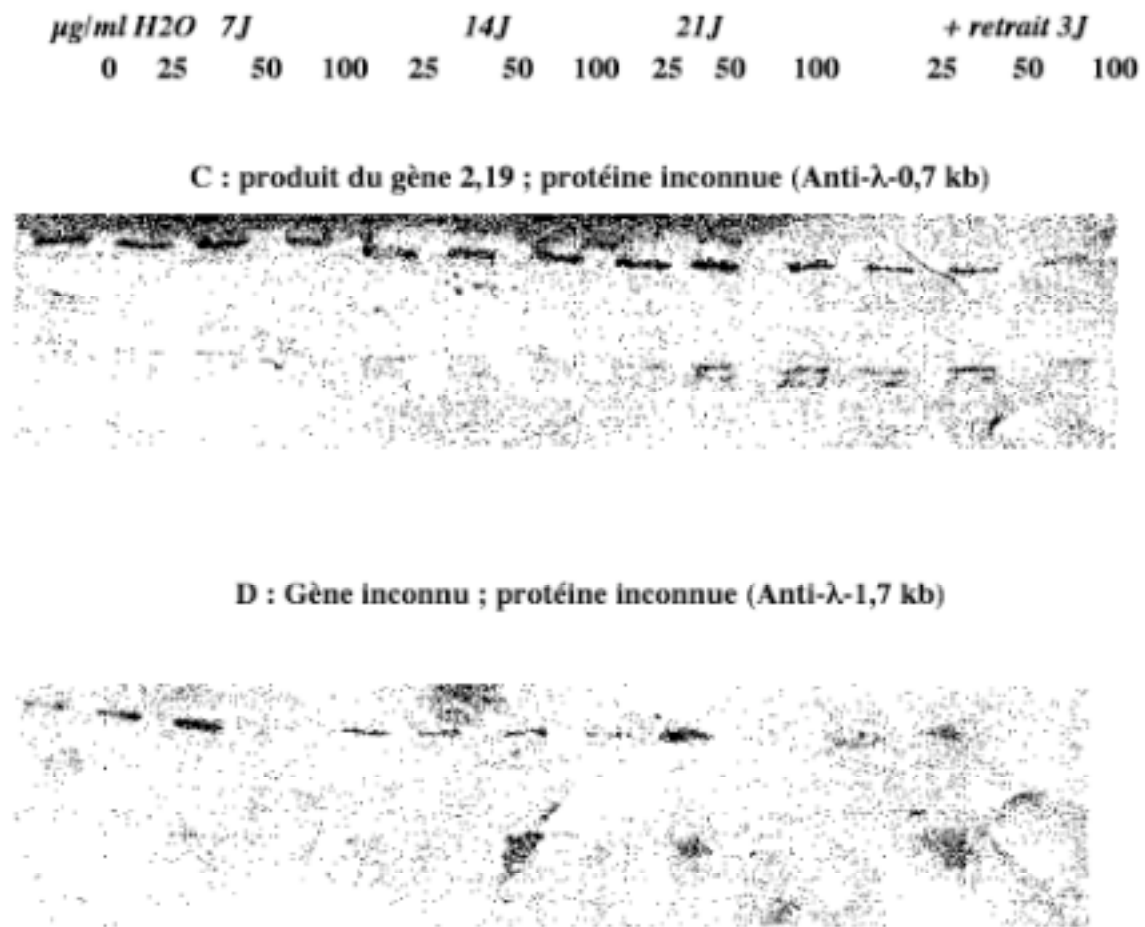


**Figure 63.** Régulation de la p40H et de la p40L du cerveau de rat par l'administration de la cotinine dans l'eau de boisson.

Les rats ont consommé les concentrations indiquées de cotinine imposée ( pas de choix), ont été sacrifiés au temps indiqués, les cerveaux prélevés et extraits directement dans le tampon de dépôt. Les protéines (équivalent à 50 µg tissu en A et à 1 µg tissu en B par piste) ont été séparées par SDS PAGE 12 %, transférées sur nitrocellulose, les membranes incubées avec le sérum anti-CRC (1 : 5000) et révélées ( $\leq 2$  min en A et 30 min en B) par le Kit Opti-4-CN (Biorad). Remarquez le paterne très différent de régulation de la p40H en A et de la p40L en B.

### C- DIT NO À LA COTININE

# MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON



**Figure 64.** Régulation des nouvelles protéines réceptrices cérébrales clonées ( $\lambda$ -0,7- et  $\lambda$ -1,7-kb) par l'administration de la cotinine dans l'eau de boisson chez le rat. Les protéines (équivalent 100  $\mu$ g tissu par piste) de cerveau de rats traités comme décrit dans la légende de la Fig. 63. Les membranes de nitrocellulose ont été incubées avec les anticorps mono spécifiques anti-clone 0,7-kb en haut et ant-1,7-kb en bas (1 : 3000) et révélées 30 min par le Kit Opti-4-CN (Biorad).

Remarquez le paterne très différent d'expression des deux protéines.

Les anticorps mono spécifiques ont été préparés par deux tours d'adsorption des anti-CRC sur filtres de nitrocellulose : le premier filtre est chargé de phage vide, le surnageant est adsorbé sur filtre chargé du phage  $\lambda$ -1,7 kb ou  $\lambda$ -0,7 kb. Les anticorps sont ensuite récupérés par la glycine à pH 2,8 et neutralisés par le Tris 1 M et utilisés à la dilution 1/2000.

**C- DIT NO À LA COTININE**

# MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON

*Clonage des récepteurs de la cotinine* pour obtenir des clones des récepteurs de la cotinine, nous avons préparé les ADNc du cerveau de rat par reverse transcription. Pour amplifier par PCR un ADNc des p40s, nous avons désigné sur la base des séquences aminoacides des peptides des p40s les amorces dégénérées du Tableau XV.

**Tableau XV.** Absence d'amplification des p40s par PCR avec les amorces dégénérées <sup>(a)</sup>.

Amorces des séquence aminoacide des peptides <sup>(b)</sup>	Orientation pour la PCR <sup>(c)</sup>
14 : 5'gAR-AAY-AAR-TAY-AAY-CAR-TT-3'	Sens
14 : 5'EcoRI-CCR-AAY-TgR-TTR-TAY-TTR-TTY-TC3'	Antisens avec Site EcoRI
14 : 5'EcoRI-ATH-gCN-TTY-YTN-gAR-AAY-AAR-T3'	Sens avec Site EcoRI
14 : 5'EcoRI-gTR-TCN-gTN-CCR-AAY-TgR-TTR-T3'	Antisens avec Site EcoRI
14 : 5'CCR-AAY-TgR-TTR-TAY-TTR-TT3'	Antisens
N-terminal : 5'EcoRI-ggN-TTY-gCN-CCN-TAY-AT3'	Sens avec Site EcoRI
N-terminal : 5'ggN-ggN-ggI-gCI-ACI-YTI-CC3'	Sens
30 : 5'ggR-TAN-gCN-ACI-ACI-CCI-CCI-CC5'	Antisens

<sup>(a)</sup>, abréviations : R = [A,g] ; Y = [C,T] ; H = [A,C,T] ; N = [A,g,C,T] ; I = inosine.

<sup>(b)</sup>, les séquences sont de (Riah et al., 2000), 30 est un autre peptide connu des p40.

<sup>(c)</sup>, ces amorces ont également été testées avec le phage d'expression  $\lambda$ -gt11.

Nous n'avons obtenu aucun clone positif ni avec la banque d'ADNc que nous avons synthétisée, ni avec la banque d'expression commerciale dans  $\lambda$ -gt11 de Clontech.

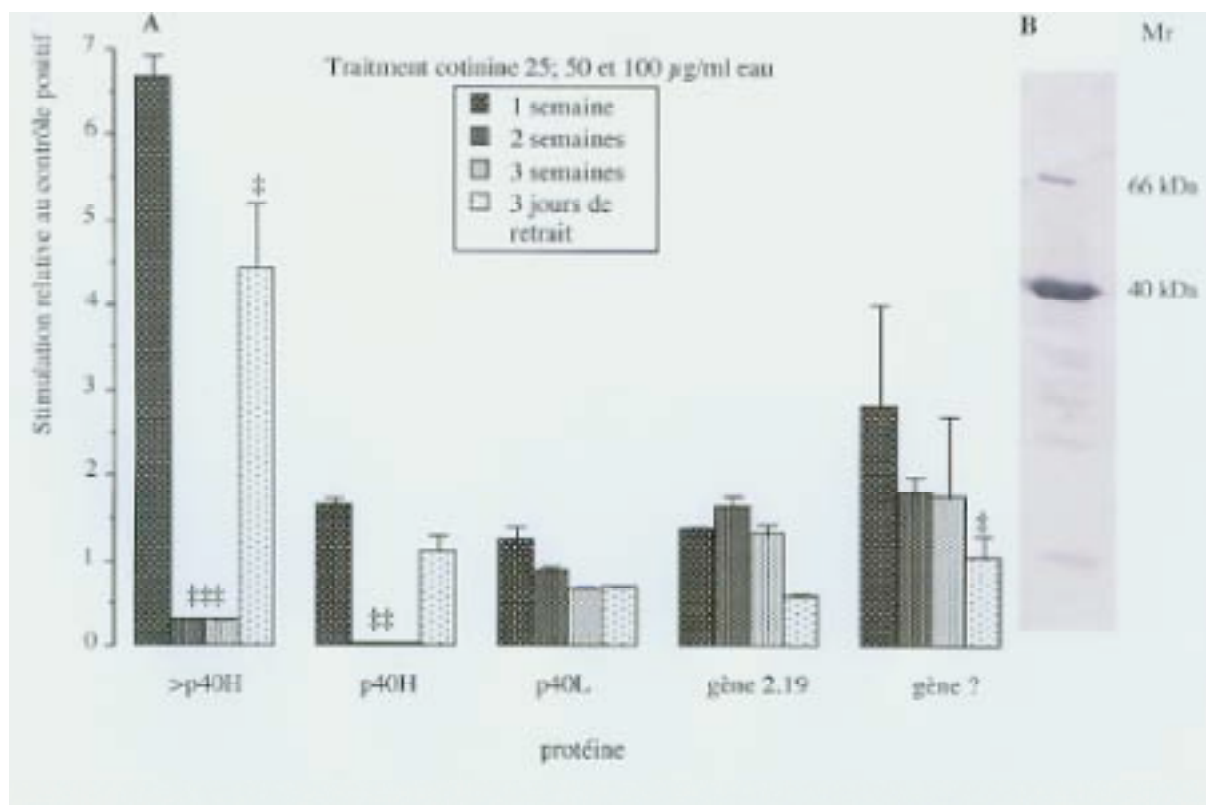
Nous avons alors procédé à un criblage immunologique avec les anticorps dirigés contre le complexe des récepteurs de la cotinine (anti-CRC) et capables de détecter les protéines p40s en Western Blot (Fig. 63). Nous avons criblé la banque d'expression commerciale du cerveau de rat dans  $\lambda$ -gt11 de Clontech et une banque d'expression de kératinocytes humains synthétisée grâce au Kit Zap express de Stratagème (don généreux du Docteur Marina WEBER). Les clones obtenus sont présentés dans le Tableau XVI.

# MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON

**Tableau XVI.** Les stratégies développées pour le clonage des récepteurs de la cotinine et clones obtenus : QTLs des addictions localisés dans les mêmes chromosomes ?

Stratégie	Clones isolés et remarques
Réaction de polymérisation en chaîne PCR matrice ADNc et $\lambda$ gt-11	Aucun : amorces trop dégénérées ?
Criblage d'expression cerveau de rat dans $\lambda$ gt-11 Chr X : 156701796-9398 Chr 18 : 37390478-609	2 clones positifs (voir Fig. 63 ; 65) sur $2.10^6$ PFU <b>Protéines inconnues</b> <b>Gène inconnu (<math>\lambda</math>-1,7 kb)</b> <b>Gène 2,19 homologue (<math>\lambda</math>-0,7 kb)</b>
Criblage d'expression épiderme humain dans Zap express Chr 17 : 41999647-42668552 Chr 11 : 35240377-278376 Chr 12 : 75697307-700586 Chr 1 : 1896283-1905583 Chr 1 : 171264041-82570 Chr 11 : 112743016-48820 Chr 12 : 75697307-700586 Chr 3 : 636284427-641596 Chr 17 : 43173977-184443 Chr 5 : 143357340-98234 Chr 12 : 75697307-700586 Chr 12 : 59341547-350366	12 clones mais aucun n'a été vérifié comme les 2 clones de la Fig. 63 ; 65 Clone 1 : $\alpha$ 1,2 mannosidase Clone 2 : kératine 10 Clone 3 : faux antisens Clone 4 : MDM 2 (mouse double minute 2) Clone 5 : ribosomal DNA Clone 6 : Profilagrine Clone 7 : BIRC 3 (baculoviral IAP repeat element) Clone 8 : MDM 2 Clone 9 : Filamine $\beta$ Clone 10 : Kératine 15 Clone 11 : TCEB1L (trans elongation factor) Clone 12 : MDM 2 Clone 13 : NR4A1 (nuclear receptor N10)

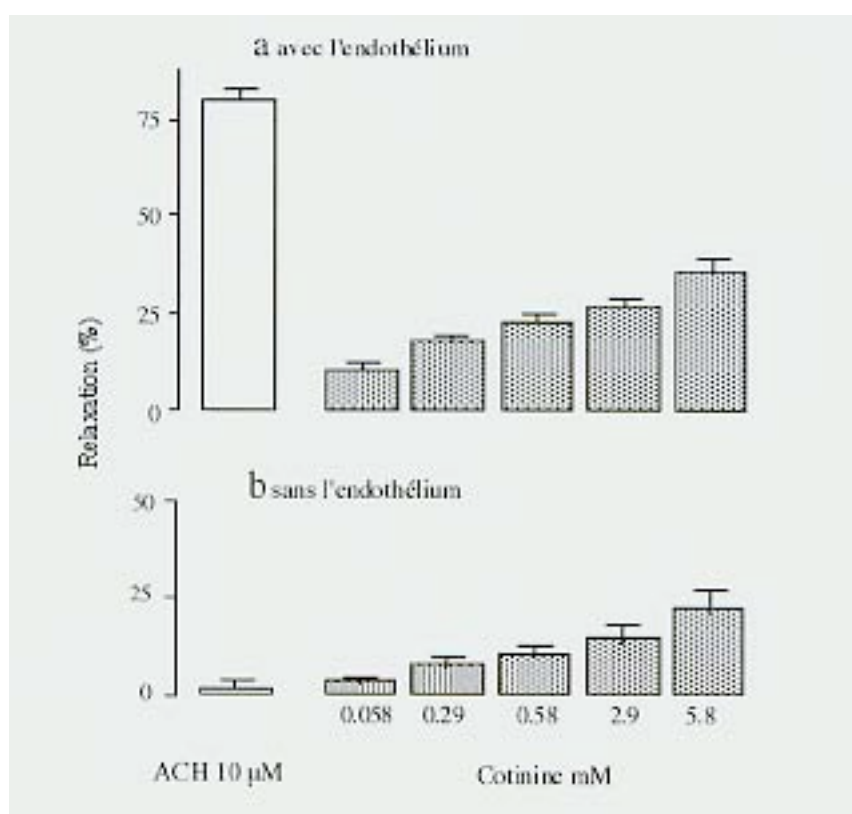
## MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON



**Figure 65.** Régulation des récepteurs centraux de la cotinine par son administration dans l'eau de boisson chez le rat. En A, les rats ont été traités et les protéines cérébrales totales analysées par Western Blot comme décrit dans la légende des Fig. 63-64. Les bandes ont été quantifiées et exprimées par rapport au contrôle non traité (0 µg/mL eau). L'effet des traitements par la cotinine a été évalué par une ANOVA une voie avec réplication. L'effet des trois doses de cotinine (25 ; 50 et 100 µg/mL eau) a été utilisé pour la réplication. En B, le transfert montre les protéines membranaires du cerveau de rat (équivalent 50 mg tissu) purifiées par chromatographie d'affinité et révélées sans réaction d'amplification par un anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline. Les marqueurs de taille (Mr) indiquent une réactivité immunologique dans le 66 et le 40 kDa. \* ; \*\* et \*\*\*, respectivement 0,05 ; 0,01 et 0,001 par rapport au traitement une semaine.

## MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON

*La cotinine relaxe l'aorte par un mécanisme dépendant partiellement de l'endothélium (activité EDRF / NO partielle)* nous avons estimé la contribution de l'endothélium aux effets de la cotinine sur la relaxation de l'aorte (Fig. 65). Les résultats montrent que la cotinine relaxe l'aorte par un mécanisme partiellement dépendant de l'endothélium, alors que l'acétylcholine relaxe l'aorte par un mécanisme totalement dépendant de l'endothélium (Fig. 65). La contribution d'une activité de type EDRF/NO aux effets de la cotinine sur la relaxation de l'aorte *in vitro* est d'environ 40 % à la plus forte concentration, alors qu'elle est de 100 % pour l'acétylcholine.



**Figure 66.** Estimation, *in vitro*, de la contribution d'un mécanisme EDRF/NO à l'activité de relaxation de la cotinine et de l'acétylcholine. La relaxation de l'aorte a été mesurée sur des anneaux d'aorte de Lapin de 2-3 mm pré-contractés avec l'adrénaline et l'activité EDRF/NO estimée comme décrit (Furchgott and Zawadzki, 1980; Vanhoutte, 1989).



# **MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON**

## **DISCUSSION**

La dérégulation de l'homéostasie des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS) provoque un stress oxydant lourd de conséquences sur la santé. Le stress oxydant serait responsable de dommages aux protéines par oxydation et ou nitration. Les protéines modifiées de cette manière peuvent contribuer à la formation des inclusions intra-cytoplasmiques caractéristiques des maladies de type Alzheimer (AD) et de Parkinson (PD) et d'autres maladies neurodégénératives présentant ces inclusions (Doré, 2002; Giasson et al., 2002). De l'autre côté, le tabagisme est responsable de dysfonctionnement de la cellule endothéliale, de la vasodilatation et il est le principal facteur de l'athérosclérose périphérique (Su et al., 1998; Chalon et al., 2000). Le challenge serait donc d'identifier parmi les 1000 composés chimique produit par la combustion du tabac lequel est pathologique et de caractériser son action. La nicotine est le principal composé du tabac, mais elle est vite métabolisée en cotinine (Bowman et al., 1959; Benowitz et al., 1983). Ces deux alcaloïdes agissent différemment sur le système cardiaque (Chahine et al., 1993; Chahine et al., 1996), la cellule endothéliale (Conklin et al., 2001) et *in vivo* (Kuo et al., 1989).

Dans la présente étude, nous avons visé les effets liés au tabagisme à travers l'étude des effets de la nicotine et de son principal métabolite, la cotinine, sur la peroxydation lipidique (PL), en relation avec les récepteurs de la cotinine. Le récepteur de la cotinine ou p40 (Riah et al., 2000) présente une forte homologie de séquence des aminoacides avec des protéines humaines impliquées dans les réactions inflammatoires du rein (Binette and Binette, 1994) et de la polyarthrite rhumatoïdes (Hain et al., 1996) et la stimulation paracrine de la croissance des cellules (Bush et al., 1998) suggérant un rôle pour la cotinine dans le stress oxydant. D'autre part, nous avons validé le protocole d'administration des alcaloïdes dans l'eau de boisson comme modèle expérimental pour l'étude des effets de leur administration sur la PL. Enfin, nous avons cloné des protéines réceptrices cérébrales nouvelles et évalué des stratégies de clonage de la p40. L'effet de l'administration de la cotinine dans ce schéma expérimental sur ces récepteurs a été évalué, par Western Blot, pour proposer leur ordre de sensibilité à la cotinine.

## **C- DIT NO À LA COTININE**

## **MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON**

Les résultats obtenus montrent que ce protocole expérimental est valable pour étudier les effets de l'administration (Fig. 58 ; Fig. 59 A et B), du retrait (Fig. 59 C ; Tableau XIV), et de l'augmentation des doses et de la durée du traitement (Fig. 60) des alcaloïdes sur la PL. Nous avons également montré que le caractère auto-perpétuation (Hermes-lima et al., 1995; Giasson et al., 2002) de la PL se retrouve lors du retrait des alcaloïdes (Fig. 59 C ; Tableau XIV). De plus, le retrait de la cotinine après une administration d'un mois à des doses 10 fois plus faible que celle de la nicotine produit des effets sur la PL, parfois plus importants que ceux de la nicotine (Fig. 59 C ; Tableau XIV). Ce caractère auto-perpétuation de la PL n'a pas le même sens à l'échelle de ses mécanismes moléculaires et physiologiques. En effet, dans nos expériences de retrait, la PL est initialisée de novo, alors qu'elle n'était pas détectable, avant de s'auto-perpétuer au cours des phases de dilution des alcaloïdes (Fig. 59 C ; Tableau XIV). Ce résultat indique que les effets de la cotinine sur la PL subissent une down régulation. Cette conclusion est confortée par la normalisation des valeurs de la PL dans tous les tissus examinés par l'administration à long terme (1 mois) de la cotinine (10C) (Fig. 60). Au-dessus de 10C, la cotinine augmente la PL du cœur (Fig. 60) et l'administration de la nicotine jusqu'à 4N n'a pas normalisé la PL (Fig. 60). L'absence de normalisation de la PL par la nicotine provient, probablement, de sa conversion en cotinine. Les effets de la cotinine sur la PL suggèrent que ses actions passent par ses récepteurs, alors que les effets de la nicotine suggèrent ses propriétés pro-oxydantes intrinsèques (Gouazé et al., 1998). En effet, la nicotine est capable d'oxyder *in vitro* les LDL's alors que la cotinine n'a pas l'activité pro-oxydante intrinsèque (Gouazé et al., 1998), sauf lorsque l'agent pro-oxydant est la 6-hydroxy dopamine (Soto-Otero et al., 2002). Ces résultats, en accord avec les effets de la cotinine sur la libération de la dopamine (Chapitre IV), indiquent que ses récepteurs peuvent induire la libération de la dopamine, qui rentre dans la cascade de la PL.

### **C- DIT NO À LA COTININE**

## **MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON**

Pour identifier les récepteurs de la cotinine responsable de ses effets, nous avons cloné dans ce travail, les produits du gène 2,19 et d'un gène inconnu (Tableau XVI ; Fig. 64). L'expression du produit de ces gènes nous a permis de purifier, par adsorption, les anticorps monospécifiques de ces deux nouvelles protéines. Ces anticorps monospécifiques nous ont permis de comparer, par Western Blot, la sensibilité des récepteurs centraux de la cotinine à son administration dans le même protocole d'administration dans l'eau de boisson (Fig. 63-64). Les résultats obtenus, en accord avec nos estimations de la sensibilité de la p40H et de la p40L à la cotinine, montrent une down régulation nette de la p40H et une résistance au traitement de la p40L (Fig. 65). Ils montrent également une nouvelle bande (Fig. 63) notée >p40 (Fig. 65) qui subit une down régulation comme la p40H (Fig. 63 ; 65). Cette bande, invisible chez le contrôle (Fig. 63 ; 65), peut provenir de la p40H par une maturation opposée à celle que nous avons observée lors de l'administration saline, un schéma stressant (Chapitre III) où nous avons discuté la dégradation de la p40H en p40L. Les deux protéines nouvelles subissent, avec une plus forte sensibilité pour le produit du gène inconnu par rapport au produit du gène 2.19 (Fig. 65), une down régulation significative lors des trois jours de retrait (Fig. 64 ; 65). Pour le produit du gène 2.19, des bandes inférieures, probablement liées à sa dégradation, sont visibles dès 3 semaines de traitement et s'accroissent avec la dose et sont visibles même lors du retrait (Fig. 64). La p40L a été visualisée après une réduction très importante des protéines à transférer de 50 à 1  $\mu\text{g}$ /piste (Fig. 63). Ce résultat peut être interprété par la spécificité des anticorps pour la p40H, leur quantité limitée à 1 : 5000 et probablement une saturation des filtres de nitrocellulose lors du transfert de 50  $\mu\text{g}$ /piste (Fig. 63). Ce résultat indique que le Western Blot est toujours une analyse semi quantitative et pose le problème de l'interprétation quand la résolution des bandes est insuffisante, comme les bandes >p40H ; p40H et p40L (Fig. 63). À ce stade, nous pouvons proposer, en tenant compte de l'homologie de séquence des p40s (Binette and Binette, 1994; Hain et al., 1996; Bush et al., 1998; Riah et al., 2000), de nos résultats sur la PL (Fig. 58-60), de l'expression des p40s dans l'ensemble des tissus examinés, y compris humains et les fractions sub-cellulaires, de l'augmentation de l'expression des p40s au cours de la croissance des

### **C- DIT NO À LA COTININE**

# **MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON**

cellules neuronales NBE (Fig. 61 ; piste 6-11) et HUVEC (non montré) en culture et de la sensibilité relative plus importante des p40s par rapport aux autres récepteurs (Fig. 63-65), que la p40 participe à l'homéostasie du stress oxydant et que l'administration de la cotinine affecte la p40 et l'homéostasie des ROS et RNS.

Afin de renseigner sur lequel des ROS ou RNS participe au stress oxydant lié à l'administration de la cotinine, la mesure de la PL n'était pas adaptée car les deux espèces radicalaire sont équivalentes dans la cascade des évènements aboutissant à la PL (Hermes-lima et al., 1995; Giasson et al., 2002). Les résultats obtenus montrent que le rein est plus résistant à la PL que les autres organes, comme le montre l'absence de PL dans le schéma d'administration au choix versus imposé (Fig. 59 C ; Tableau XIV). Ce résultat, à côté des autres caractéristiques de cet organe, comme sa sensibilité au tabagisme (Orth et al., 2001) et son expression de la NO synthase neuronal (Welch and Wilcox, 2002), peut suggérer une inhibition du rétrocontrôle tubule glomérule des alcaloïdes. Comme le NO assure le rétrocontrôle tubule glomérule (Wang et al., 2002), la dérégulation de l'homéostasie du stress oxydant peut résulter donc d'un effet sur le NO et ou ses espèces réactives (RNS). Cependant, le rein utilise également d'une manière plus importante les acides gras (AG) par la  $\beta$ -oxydation (Commandeur and Vermeulen, 1990) et ces AG sont les initiateurs de la PL. Cette consommation d'AG peut donc réduire la PL dans cet organe. Quoi qu'il en soit, les deux mécanismes (i. e capture et utilisation des AG) peuvent coexister, mais nos résultats démontrent clairement que les effets des alcaloïdes sur la PL sont cumulatifs (Fig. 59 C). En effet, les deux schéma expérimentaux (i. e. imposé et choix) ne diffèrent que pendant les 14 premiers jours de traitement où l'alcaloïde est contrebalancé (choix) ou non (imposé) par une solution d'eau, alors que durant les jours suivants, tous les groupes ont le choix. Ces résultats et les rôles bien établis du NO dans le rein (Ortiz and Garvin, 2002; Pallone and Mattson, 2002), ses effets complexes (Blantz et al., 2002) et ses interactions avec l'anion super oxyde dans le contrôle de la fonction rénale (Majid and Nishiyama, 2002)

## **C- DIT NO À LA COTININE**

## **MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON**

indiquent que les alcaloïdes peuvent affecter les ROS et les RNS dans l'ensemble des tissus examinés pour aboutir à la PL.

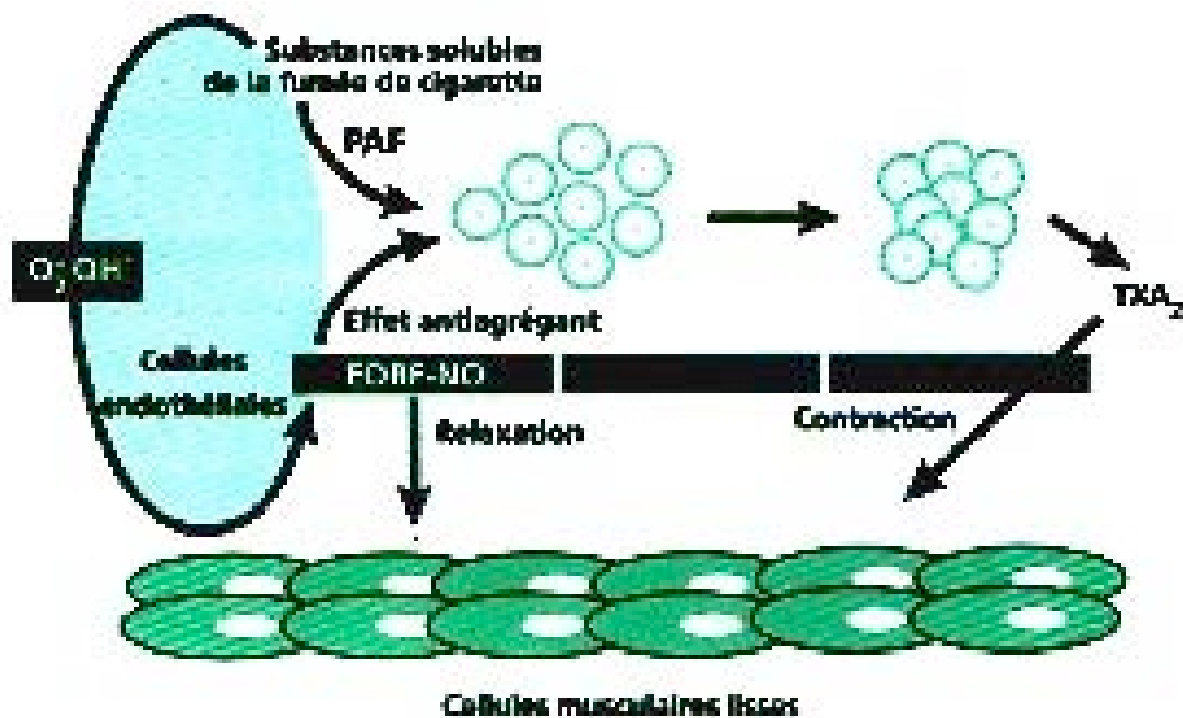
Pour tirer une conclusion sur l'action primordiale de la cotinine, nous avons évalué la contribution de l'endothélium à son activité vasodilatatrice, laquelle activité permet d'attribuer la vasodilatation à l'EDRF (endothélium dependent relaxation factor) (Furchgott and Zawadzki, 1980; Vanhoutte, 1989), qui a été identifiée par la suite comme étant le NO (Ignarro et al., 1987; Palmer et al., 1987; Snyder and Brecht, 1991). Les résultats obtenus (Fig. 66), en accord avec la nature différente des récepteurs de la cotinine et de l'acétylcholine (Riah et al., 2000), montrent que l'activité vasodilatatrice de la cotinine est partiellement dépendante, alors que celle de l'acétylcholine est totalement dépendante (Furchgott and Zawadzki, 1980; Vanhoutte, 1989) de l'endothélium (Fig. 66). Bien que la vasodilatation par la cotinine ait été observée à des concentrations largement supérieures à celles (Fig. 65) de Conklin *et al.*, (Conklin et al., 2001) ces auteurs ont procédé différemment. En effet, ils avaient incubé *in vitro* une nuit les vaisseaux avec la cotinine 100 nM avant de mesurer la vasodilatation induite par un donneur de NO (Conklin et al., 2001). Ces résultats montrent donc que l'effet dépend de la concentration et de la durée de l'incubation. Ces observations sont en accord avec le shift des récepteurs de la cotinine vers des états de très haute affinité après administration de la cotinine ou un facteur de stress (Chapitre III). Ils permettent donc de proposer que l'altération de la fonction endothéliale chez le fumeur est dépendante de la durée de son tabagisme et que le NO finit par participer aux effets de la cotinine.

En conclusion, ce travail montre que l'administration de la nicotine et de la cotinine dans l'eau de boisson affecte le statut des ROS et RNS et produit un stress oxydant mesurable par la PL. Les mécanismes des effets de la nicotine et de la cotinine sur la peroxydation lipidique semblent différents. La nicotine peut produire un stress oxydant, au moins en partie, par son activité pro-oxydante intrinsèque et probablement par sa conversion en cotinine. Cette dernière active ses récepteurs, particulièrement le p40, pour produire un stress oxydant lié à la dérégulation de l'homéostasie des ROS et RNS. Les rôles du NO dans un grand nombre de

### **C- DIT NO À LA COTININE**

## MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON

processus physiologiques font de lui un messenger critique dans l'initiation et l'acquisition des fonctions simples et complexes, comme la mémoire à long terme (Kemenes et al., 2002). Le fait récent que les inhibiteurs du NO diminuent les signes de retrait des opioïdes, de l'alcool et de la nicotine supporte, indirectement, qu'il peut contribuer à la sévérité du syndrome de retrait des substances de dépendance (Tayfun Uzbay and Oglesby, 2001). La présente étude permet donc de proposer que la cotinine participe, via ses récepteurs, les messagers RNS et ROS, à l'initiation et au syndrome de retrait tabagique et aux conséquences du tabagisme sur la santé. Ci-dessous, une illustration des mécanismes de l'athérosclérose et des maladies cardiovasculaires (Fig. 67).

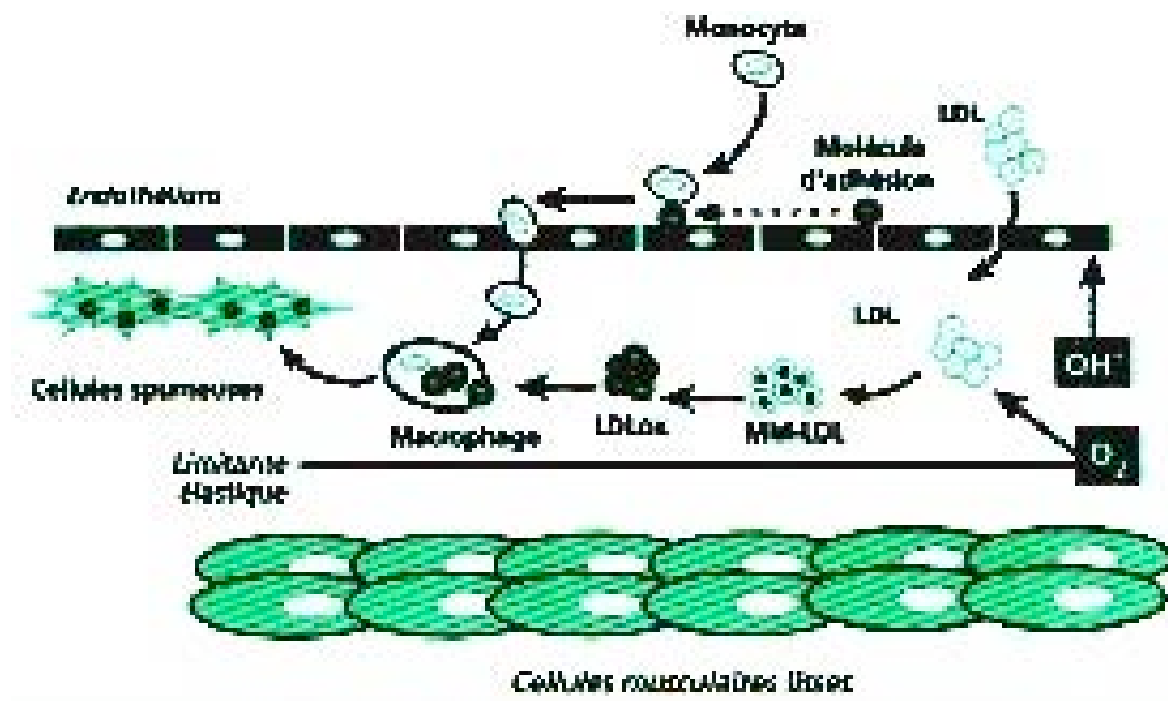


A : Représentation schématique des mécanismes par lesquels la fumée de cigarette favorise l'activation plaquettaire et la vasoconstriction.

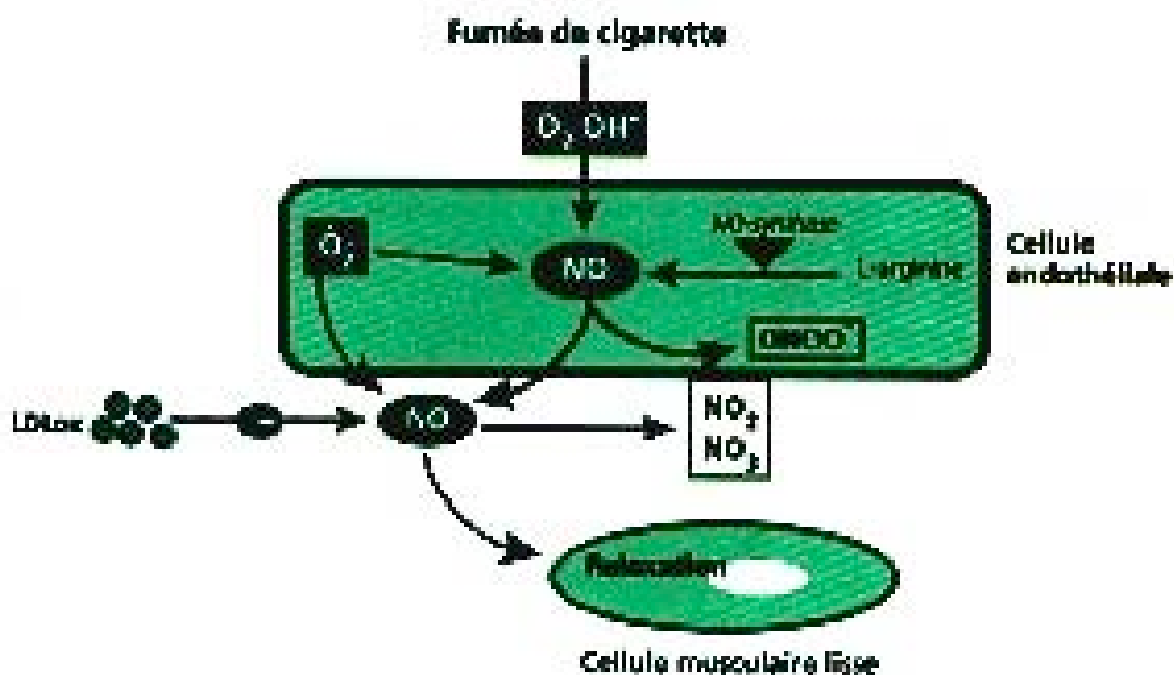
Abréviations : PAF, facteur d'activation plaquettaire ; EDRF-NO, monoxyde d'azote-facteur de relaxation endothélial ;  $TXA_2$ , thromboxane A2 ; LDL, low density lipoprotein ; LDL-MM, LDL modérément oxydées.

### C- DIT NO À LA COTININE

**MÉCANISMES ET EFFETS DE L'ADMINISTRATION ET DU RETRAIT  
DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE DANS L'EAU DE BOISSON**



**B :** Représentation schématique du mécanisme de formation des cellules spumeuses. L'oxydation des LDL par les radicaux libres de l'oxygène stimule la diapédèse de monocytes à travers l'endothélium vasculaire et la formation des cellules spumeuses.



**C :** Représentation schématique de l'inter play entre les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et du nitrogène (RNS) et les LDL. Le NO produit par la cellule endothéliale est inactivé par les ROS et par le LDL cholestérol oxydé (LDL-ox).

Figure 67. A, B et C : Mécanismes liant le NO, le système cardiovasculaire et le tabagisme.

**C- DIT NO À LA COTININE**

## **DISCUSSION GENERALE**

## **DISCUSSION GENERALE**



## DISCUSSION GENERALE

Ce travail a été consacré à la cotinine qui a été ignorée, depuis sa découverte dans les années 1960, par la majorité de la communauté scientifique et des Laboratoires pharmaceutiques. Nous l'avons orienté dans trois directions complémentaires et nécessaires pour répondre au besoin scientifique que nous avons ressenti dès le début de nos travaux. Ces directions ont progressé, parfois en parallèle et parfois indépendamment l'un de l'autre. Nous avons besoin de synthèse chimique pour disposer d'alcaloïdes, surtout de la cotinine pure, car on a souvent attribué certaines de ses activités à la contamination par la nicotine, et de quantité suffisantes vu sa faible toxicité. Lorsque notre conviction a progressé vers les mécanismes d'action spécifiques de la cotinine, nous avons synthétisé le gel d'affinité permettant d'isoler ses récepteurs. Dans la deuxième direction, nous avons développé les outils permettant d'évaluer les effets des alcaloïdes, dont le gel d'affinité, le radioligand, les anticorps des récepteurs de la cotinine et les ADNc des récepteurs de la cotinine. Avec ces outils, nous avons évalué les effets des alcaloïdes dans deux contextes différents. Le premier contexte est celui de l'administration en solution saline isotonique, un modèle qui produit un stress, où les interactions de la nicotine et de la cotinine seront indirectement évaluées, c'est-à-dire sur un fond de stress inhérent à l'expérimentation. Ce protocole expérimental stressant a été complété par le protocole administration dans l'eau de boisson, où les interactions de la nicotine et de la cotinine seront directement évaluées. De plus, la sensibilité des récepteurs à l'administration de la cotinine a été validée dans les deux protocoles. Ces résultats ont été largement discutés dans le cadre de l'action des alcaloïdes dans le cadre particulier du tabagisme. Dans la suite, nous allons les discuter, dans le cadre général des substances responsables de dépendance, pour mieux les situer et apprécier la validité de ce travail.

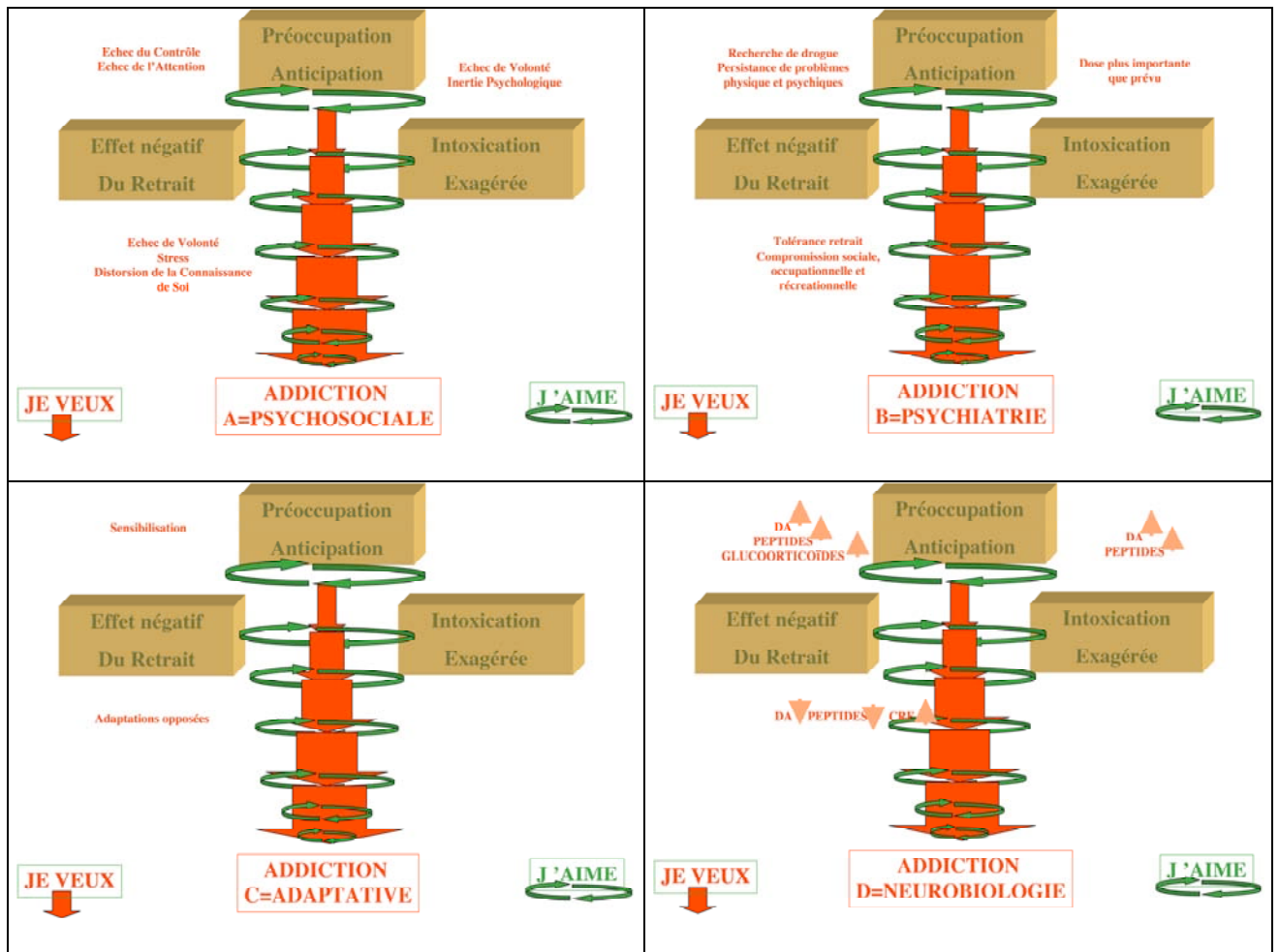
**Dans la structuration de la dérégulation de l'homéostasie hédoniste** (Koob et al., 1997; Koob and Le Moal, 1997), la compréhension des mécanismes neurobiologiques des addictions nécessite d'intégrer les données basiques des neurosciences avec les sciences

## **DISCUSSION GENERALE**

psychosociales, la psychologie expérimentale et la psychiatrie. L'addiction peut-être représentée comme un enfoncement qui augmente dans la spirale de la dérégulation du système cérébrale de la récompense pour aboutir à un usage compulsif de la drogue et la perte du contrôle sur sa consommation (Fig. 68).

Les résultats obtenus dans ce travail confirment que ces deux alcaloïdes affectent la récompense [(Fig. 34-35)], qu'il existe un inter play entre les mécanismes de la récompense [(Fig. 41)] et la manipulation possible de ces mécanismes [(Fig. 38-39)].

## DISCUSSION GENERALE



**Figure 68.** Diagramme représentant la spirale du cycle détresse addiction dans les

conceptions A : psychosociale ; B : psychiatrique ; C : adaptative et D : neurobiologique.

Dans tous les cas, trois composants majeurs sont présents : préoccupation & anticipation ; intoxication exagérée ; syndrome de retraits. Les flèches indiquent les activités de DA, dopamine, CRF, facteur libérant la corticotropine.

Le cycle de l'addiction est conçu comme une spirale qui nous entraîne avec plus de force vers l'usage et avec la répétition de l'usage jusqu'à l'état pathologique final nommé l'addiction (dépendance) (Koob and Le Moal, 1997)

## DISCUSSION GENERALE

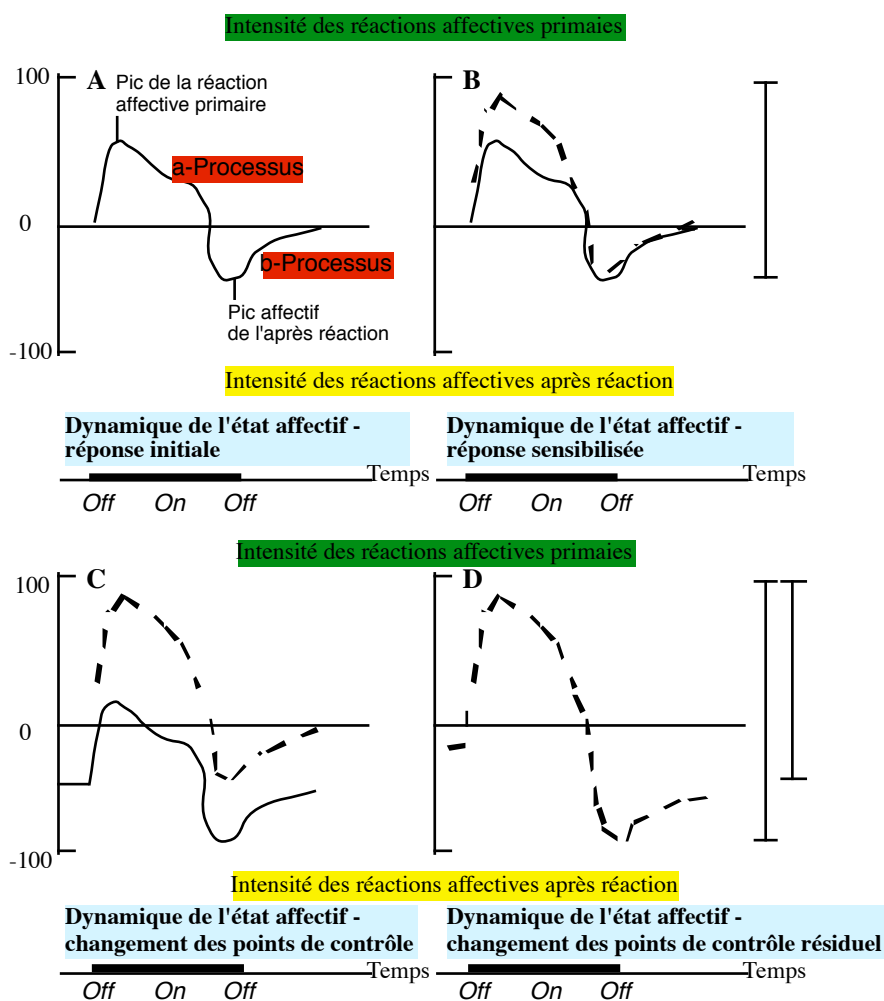
Les sensibilisations et les adaptations qui s'y opposent sont supposées contribuer à la dérégulation de l'homéostasie hédoniste. Nous avons montré certaines adaptations aiguës [Fig. 23 ; 47-51 ; Tableau VIII ; IX] et chroniques [Fig.24-27 ; 52-56] de certains mécanismes biochimiques et comportementaux [Fig. 47-56] d'action et d'interaction de ces deux alcaloïdes. La sensibilisation a également été observée [(Fig. 38-39)].

Les mécanismes neurobiologiques impliqués, comme le système mésocorticolimbique dopaminergique [(Fig. 29-31)], le système peptidique opioïde [(Fig. 43)] et les systèmes de stress cérébral [(Tableau VIII ; IX)] sont en cours de caractérisation, nous avons montré qu'ils peuvent avoir une grande importance dans le cas de ces deux alcaloïdes.

Cette conception structurée de la spirale de dérégulation de l'homéostasie hédoniste donne une approche réaliste pour identifier les facteurs neurobiologiques responsables de notre vulnérabilité à la dépendance, et à la rechute chez les individus ayant un passé d'addiction.

**Dans la théorie des processus contraires de Solomon et Corbit** (Robinson and Berridge, 1993) (Fig. 69) (*théorie des contrastes*), les processus (a) sont les effets hédonistes positifs. Ils font leur apparition dès la présentation du renforçateur et montrent une tolérance [(Fig. 34)]. Au contraire, les processus (b) sont les effets hédonistes négatifs. Ils apparaissent après que les processus (a) se soient arrêtés, baissent lentement et s'amplifient avec la répétition de l'exposition [(Fig. 39; groupe 0,5C)]. Ils peuvent disparaître complètement [(Fig. 39 groupe 0,05C)]. Des données et des conceptions plus récentes suggèrent qu'en réalité, les processus (b) apparaissent juste après le début des processus (a) et aboutissent [(Fig. 41)] au changement dans les points de contrôle de la régulation de la réponse hédoniste.

## DISCUSSION GENERALE



**Figure 69.** Diagramme représentant les points de contrôle de l'homéostasie hédoniste dans la théorie des processus contraires de Solomon et Corbit (1974) (Robinson and Berridge, 1993) et son extension pour tenir compte de la spirale du cycle de l'addiction (Koob and Le Moal, 1997). Les quatre diagrammes traduisent la réponse affective au stimulant (drogue). A = état initial=somme des processus a et b. Aucune expérience antérieure de la drogue. B=l'usage intermittent peut aboutir à la sensibilisation de la réponse en pointillé (trait plein=réponse initiale A). C=forte dépendance, la réponse affective avec les changements supposés des points de contrôle=dérégulation de l'homéostasie hédoniste (trait en pointillé=la réponse sensibilisée B). D=abstinence prolongée, vulnérabilité à la rechute=addictions chroniques avec changements de longue durée dans les points de contrôle et la sensibilisation résiduelle.

## DISCUSSION GENERALE

L'intensité de la perturbation de la réponse hédoniste est indiquée par la barre de droite, le temps d'action du stimulant est indiqué en bas des diagrammes.

**Dans la théorie de la sensibilisation**, la réponse est augmentée par la présentation intermittente répétée du renforçateur (drogue) [(Fig. 46, 47, 51) et ou, est maintenue alors que le renforçateur est dilué directement (Fig. 37) ou indirectement (métabolisme : Tableau XIV)]. La sensibilisation pourrait être un facteur significatif dans la différence de vulnérabilité des individus à certains des concepts de la spirale de l'addiction (Fig. 68).

La théorie de la sensibilisation invoque un shift vers un état de renforcement de la récompense [(Fig. 38-39)], définit comme un état neuronal hypersensible qui produit l'expérience du JE VEUX. Cet état serait le résultat de l'induction par les drogues d'une sensibilisation du système dopaminergique mésocorticolimbique. Ainsi, l'exagération pathologique du JE VEUX durant une abstinence prolongée devrait être le résultat, en grande partie, d'une hyper activité du système dopaminergique mésocorticolimbique (Robinson and Berridge, 1993).

La sensibilisation a été souvent étudiée par l'augmentation des effets moteurs lors de l'administration répétée du stimulant (i. e. drogue de dépendance) [(Fig. 48) et ou par le retrait (Fig. 48) et ou par les réponses émotionnelles (Fig. 47), exploratoires (Fig. 49-52), d'anxiété (Fig. 51 ; 56) et le stress de la peroxydation lipidique (Tableau XIV ; Fig. 59)]. Des travaux récents ont étendu ces effets à une augmentation progressive de la valeur du renforcement de la drogue, du moins durant l'acquisition initiale de la recherche de la drogue ou de ses effets conditionnés. La sensibilisation est également plus facile à observer lorsque l'exposition est intermittente [(Fig. 48, 51)] plutôt que chronique [(Fig. 47-50)]. Cette dernière favorise la tolérance [(Fig. 52-55)]. De plus, la sensibilisation est de longue durée et se compte en semaines après l'administration [(Fig. 48, 51 ; Tableau XIV ; Fig. 59)].

## **DISCUSSION GENERALE**

**Une baisse de régulation** peut être définie comme une perte du self-contrôle. Un conflit ou une inadéquation des normes résulterait dans la défaillance dans les mécanismes du self-contrôle. La réduction dans le contrôle est l'inaptitude d'une personne à évaluer son soi et ses actions envers des normes pertinentes. L'inadéquation des forces est analogue au concept de force de la volonté au sens commun. Elle représente un conflit entre la force de l'impulsion et la tendance dans l'action d'agir et les mécanismes de self-contrôle pour arrêter cette réponse et prévenir l'action.

**L'absence de régulation** peut être définie comme l'exercice d'un contrôle qui n'aboutit pas au résultat attendu ou donne un résultat alternatif. Le plus souvent, elle implique un manque dans certaines connaissances, spécialement la connaissance de soi. Ce manque concerne les fausses croyances, la distorsion des croyances, les généralisations abusives et les efforts de contrôle non dirigés.

**Les paternes d'activité causale tardifs** sont des comportements qui transforment le déficit de courte durée (dans le self-contrôle) en une grande indulgence ou attitude explosive. Plusieurs facteurs contribuent à ces paternes comportementaux comme la baisse de régulation, les réponses émotionnelles, le stress, l'intolérance, la spirale de la détresse et autres (Baumeister and Heatherton, 1994).

L'implication du concept de l'homéostasie dans la vie de tous les jours nous oblige à retourner à la psychologie sociale, mais avec une perspective biologique. Le système cérébral hédoniste pourrait avoir des ressources limitées. Le concept d'énergie limité dans un système hédoniste remonte à Carl Jung (1948) qui regardait le psychisme comme un système relativement fermé. Cette énergie limitée a été exprimée par le terme « libido » qui initialement décrit un instinct vital général ou énergie psychique. Jung écrivait : « comme notre expérience est confinée à des systèmes relativement clos, nous ne sommes jamais en

## **DISCUSSION GENERALE**

position d'observer une entropie psychologique absolue, mais plus le système psychologique est ouvert plus le phénomène d'entropie se manifeste clairement (un système est absolument fermé quand aucune énergie de l'extérieur ne peut le nourrir) ». L'individu peut dépenser ses ressources rapidement dans l'abus des drogues ou tout autre attitude compulsive au risque d'entrer dans la spirale de dérégulation hédoniste du cycle de l'addiction. De l'autre côté, l'individu peut adopter une approche plus régulière hédoniste Calviniste, où l'utilisation du système de la récompense rentre dans les limites de l'homéostasie (c'est-à-dire sans développer les effets négatifs). Le système théologique de Calvin et ses successeurs est marqué par une forte accentuation de la souveraineté de dieu, l'esprit corrompu de l'homme et la doctrine de la prédestinée. Le Calvinisme est caractérisé par un style de vie strictement discipliné équivalent à la morale et avec le sens de l'unité des croyances. Les Calvinistes et les Puritains qui ont succédé, par rapport au choix de vie personnel, exigeaient d'eux-mêmes une réforme de caractère, un rejet des loisirs et des mondanités vaines, la sobriété et l'obéissance à dieu. Cette vue ascétique peut ou non correspondre à certaines normes culturelles, mais elle a probablement un sens biologique.



## **CONCLUSION GENERALE**

En tenant compte des critères théoriques et pratiques, applicables dans le cadre des addictions, que nous avons discuté en introduisant nos résultats entre [\_\_\_], on peut conclure qu'il devrait y avoir dans l'addiction tabagique une double dépendance : une dépendance à la nicotine et une autre à la cotinine, chacune s'exprimant à sa manière. Pour la nicotine c'est plutôt au cours de son administration que ses effets vont apparaître et lorsqu'ils bénéficient de la potentialisation par sa conversion progressive en cotinine. Pour la cotinine, c'est plutôt au cours du retrait que ses effets stressants vont s'amplifier et participer à la sévérité du sevrage. Ces raisons dans le cadre de l'addiction nous mènent à considérer l'activité pro-oxydante de la nicotine et sa conversion en cotinine. Cette dernière semble agir par des récepteurs, surtout la p40, sur la dopamine du système limbique et les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et du nitrogène (RNS). Ces messagers secondaires sont des éléments clés dans les mécanismes de la récompense et par conséquent la dépendance. Cependant, les travaux ne permettent pas encore de conclure si la p40 a une activité NO synthase ou réceptrice du NO, impliquée dans la cascade de libération de la dopamine et le stress oxydant. Les travaux discutés, les données du clonage et les séquences disponibles des aminoacides ainsi que la régulation des récepteurs de la cotinine suggèrent que la p40 joue le rôle récepteur au NO actuellement recherché. Des travaux futurs devront s'orienter dans cette voie pour répondre directement à cette question. Cette conclusion est supportée par la modulation par la cotinine de l'effet récompense de la nicotine, de la cocaïne et de l'alcool. Elle prévoit une hypersensibilité au NO lors du retrait. Dans ce cadre, les antagonistes du NO ont été rapportés efficace pour réduire la sévérité des symptômes de sevrage de toutes les substances de dépendance. Ces travaux supportent la conclusion que la cotinine endogène a une origine biosynthèse.

## **MATERIELS ET METHODES**

### **MATERIELS ET METHODES**

**CE CHAPITRE DÉCRIT LES GÉNÉRALIÉS, POUR LES SPÉCIFICITÉS SE REPORTER AUX LÉGENDES DES FIGURES ET TABLEAUX DES CHAPITRES RÉSULTATS. LES PROCÉDURES DÉCRITES DANS DES KITS N'ONT PAS ÉTÉ REPRISES, VUE L'ÉVOLUTION DE CE MARCHÉ, SE REPORTER AUX KITS ACTUALIS.**

## MATERIELS ET METHODES

Tous les protocoles expérimentaux impliquant les animaux vivants étaient en accord avec les directives du *Guide de la Protection et de l'Usage des Animaux de Laboratoire*. Ils ont été approuvés par le Comité Usage et Protection des Animaux de Laboratoire de l'Université Paul Sabatier.

De plus le candidat est habilité à réaliser et diriger des expérimentations chez l'animal de Laboratoire (certificat Niveau I : Utilisation et Protection des Animaux de Laboratoire 1999).

### **I\_ LE MATÉRIEL BIOLOGIQUE.**

**1.1. Les insectes.** Notre étude a porté sur deux espèces de mouches de la famille des calliphoridées, vulgairement appelées mouches à viande. L'espèce *Calliphora vomitoria* (C.v.) ou mouche bleue de la viande mesure 9 à 14 mm et l'espèce *Lucilia caesar* (L.c.) ou mouche impériale, de couleur verte, mesure 6 à 11 mm. Les mouches ont été maintenues dans un bêcher de 250 ml grâce à une gaze, à la température ambiante, l'humidité de l'air était de 72%. Les mouches avaient libre accès à une solution de glucose.

**1.2. Le poisson *Torpinidae*.** C'est l'organe électrique de ce poisson qui nous a servi pour l'étude des nAChRs périphériques.

**1.3. Les souris.** Notre étude a porté sur les souris Swiss mâles et femelles pesant 24-34 g. Elles proviennent de notre élevage ou ont été achetées (Centre d'élevage DEPRÈS FRANCE). Elles ont été maintenues au rythme de la lumière naturelle à une température de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ . Elles avaient accès à la nourriture (Rat chow A04) et à l'eau "*ad libitum*". Les souris ont été maintenues au moins trois jours à l'endroit de l'expérimentation avant la manipulation.

## MATERIELS ET METHODES

**1.4. Les rats.** Nous avons utilisé des rats Sprague Dawley (IFFA-CREDO FRANCE) mâles ou femelles. Les rats ont été maintenus au moins trois jours avant l'expérimentation à la température de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  au rythme de la lumière naturelle. Ils ont reçu de l'eau et de la nourriture standard (A04) "*ad libitum*".

**1.5. Les Lapins.** Des lapins New-Zélandais de 5-7 Kg ont servi pour préparer les anneaux de l'aorte avec et sans endothélium et pour extraire les récepteurs de la cotinine.

**1.6. Kératinocytes et cellules humaines.** Les kératinocytes ont été isolées à partir de peau de donneurs. La fraction soluble dans le tampon NP40 est un don gracieux du docteur M. Weber. Les cellules de type vasculaire HUVEC (Human Umbilical Vascular Endothelial Cell) et neuronal (BE) humaines sont des lignées établies.

**1.7. Les bactéries.** Nous avons utilisé les souches de bactéries indicatrices de  $\lambda\text{gt}11$  (souche y1090) et de  $\lambda\text{ZAP}$  express (souche XL1-blue MRF' pour le criblage et XL0LR pour l'excision *in vivo*) fournis dans les Kits respectifs.

**1.8. Les phages.** Nous avons utilisé le phage  $\lambda\text{gt}11$  d'expression de la banque d'ADNc du cerveau de rat commercial (Clontech) et le phage  $\lambda\text{ZAP}$  express exprimant la banque d'ADNc des kératinocytes isolés de la peau de donneurs humains. Le phage  $\lambda\text{ZAP}$  express a été construit à partir du Kit commercial (Stratagene). Les deux phages ont été utilisés pour cribler les banques d'ADNc avec le sérum immun dirigé contre les protéines liant la cotinine (ou complexe p40).

## MATERIELS ET METHODES

### **II\_ LES SOLVANTS.**

Tous les solvants utilisés sont de qualité rigoureusement pure (RP) ou grade HPLC. Les suivants proviennent par exemple de : Acétone (CARLO ERBA). Acide chlorhydrique (PROLABO). Ammoniac (PROLABO). Azote liquide. Benzène (SIGMA). Dichlorométhane (PROLABO). Ethanol (SIGMA). Hydrate 3-((3-Cholamidopropyl)-diméthyl-ammonio)-1-propansulfonate (**CHAPS**) (ALDRICH). Liquide de scintillation INSTA-GEL (PACKARD Camberra Company). Méthanol (SIGMA)...

### **III\_ LES RÉACTIFS.**

Acide carboxylique (+/-)-trans-4-cotinine (carboxycotinine) (ALDRICH). Bis (N,N'-Méthylène-bis-acrylamide) (BIO-RAD). Bleu de bromophénol (MERCK). Dicyclohexylcarbodiimide (**DCC**) (ALDRICH). Ether anesthésique (GIFRER BARBEZAT FRANCE). Gel Sépharose EAH 4-B (PHARMACIA BIOTECH) (bras espaceur de 10 atomes). Glycérol (SIGMA CHEMICAL Co.).

Glycine (PROLABO). Phenylmethanesulfonyl fluoride (**PMSF**) (ALDRICH). Hydrochloride N'-(3-Diméthylaminopropyl)-N-éthyl-carbodiimide (**EDC**) (ALDRICH). Hydroxyl ammonium (PROLABO).

Persulfate d'ammonium (MERCK). Propylamine (ALDRICH). Réactif de dosage des protéines (DC Protein Assay) (BIO-RAD). Sodium dodécyle sulphate (SDS) (PROLABO). Acrylamide (99,9%) (BIO-RAD). Adsorbant Bio-Beads SM-2 (BIO-RAD). Filtres WHATMAN en microfibre de verre de type GF/B de diamètre 25 mm et de nitrocellulose pure (POLYLABO). Isopentane (SIGMA). Ligands : nicotine et normicine sont de Sigma.

## MATERIELS ET METHODES

La cotinine et la N-oxide de cotinine ont été synthétisées selon le protocole de Bowman et Mc Kennis et Dagne et Castagnoli, respectivement. Marqueurs de masse molaire (Standard de SIGMA). Membrane de dialyse SPECTRAPOR (Seuil de coupure : 6 000-8 000) (SPECTRUM MEDICAL INDUSTRIES). Plaques de silice pour CCM ALUGRAM SIL G/UV 254 (MACHEREY-NAGEL). Les réactifs pour la culture des bactéries sont de grade Biologie Moléculaire. Le milieu DMEM et les suppléments pour la culture cellulaire proviennent des fournisseurs spécialisés.

### **IV\_ LES RADIOLIGANDS.**

La [ $^{125}I$ ]cotinine (BEHRING DPC): Activité spécifique =  $3500 \cdot 10^{10}$  Bq.g<sup>-1</sup> (3500 Ci.g<sup>-1</sup>). Quantité fournie =  $5,5 \cdot 10^4$  Bq (5,5  $\mu$ Ci) lyophilisée. Masse molaire = 458 g.mole<sup>-1</sup>. Stockage à 4°C 8 semaines maximum. Pureté > 90%.

La [ $^{125}I$ ] $\alpha$ -bungarotoxine ( $\alpha$ -Bgt) (AMERSHAM) : Activité spécifique =  $220 \cdot 10^{10}$  Bq.mmole<sup>-1</sup> (220 Ci.mmole<sup>-1</sup>). Quantité fournie = 106 Bq dans 200  $\mu$ l (106  $\mu$ Ci). Stockage à 4°C dans de la sérum albumine de bovin (BSA) 1 mg.ml<sup>-1</sup> en présence d'azide de sodium 0,02%. Pureté > 95%.

La [ $^3H$ ]nicotine (NEN DUPONT DE NEMOURS) : Activité spécifique =  $78,4 \cdot 10^{10}$  Bq.mmole<sup>-1</sup> (78,4 Ci.mmole<sup>-1</sup>). Quantité fournie =  $2,5 \cdot 10^6$  Bq dans 250  $\mu$ l (250  $\mu$ Ci). Stockage à -20°C dans l'éthanol absolu. Pureté > 95%.

La [ $^3H$ ]noradrénaline et la [ $^3H$ ]dopamine : Activité spécifique = 70-80  $10^{10}$  Bq.mmole<sup>-1</sup> (70-80 Ci.mmole<sup>-1</sup>). Quantité fournie =  $2,5 \cdot 10^6$  Bq dans 250  $\mu$ l (250  $\mu$ Ci). Stockage de la dopamine à -20 °C et de la noradrénaline à +4°C.

## MATERIELS ET METHODES

### **V\_ L'APPAREILLAGE.**

Analyseur d'images BIOCOM (version 1.50 b). Appareil HPLC (Spectra-Physics), équipé d'un distributeur automatique d'échantillon. Centrifugeuse (BECKMAN Model J2-21 rotor JA-20). Compteur à scintillation (BECKMAN). Compteur Gamma Crystal 5400 Series (PACKARD). Cuve d'électrophorèse (BIO-RAD). Cuve millipore à 12 trous (MILLIPORE). Développeur RX XP 505 (3M). Microtome (tissue TEK II MILES). Ordinateurs PC (IBM) ou Macintosh (Apple). Pompe péristaltique (GILSON MEDICAL ELECTRONICS). Spectromètre de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) (BRUKER AM 300). Homogénéisateur (BIRKMANN POLYTRON). Spectrophotomètre (VITATRON). Spectrophotomètre infrarouge 298 (PERKIN-ELMER). Ultracentrifugeuse (BECKMAN). Table de Spectrophotomètre UV.

### **VI\_ LES MÉTHODES.**

**6.1. Synthèse de la cotinine et de la N-oxide cotinine.** La cotinine et la N-oxide cotinine, utilisées dans ce travail, ont été synthétisées et identifiées par des méthodes chimiques et spectrales comme décrit respectivement par Bowman & Mc Kennis et Dagne & Castangoli.

**6.2. Étude de l'activité insecticide chez la mouche à viande.** On se place dans les conditions où sont généralement utilisés les insecticides. Nous avons pulvérisé 1 ml d'eau distillée (H<sub>2</sub>O) sur les mouches témoins ou 1 ml d'H<sub>2</sub>O contenant une concentration donnée d'un alcaloïde ou d'un mélange d'alcaloïdes, sur les autres.

## **MATERIELS ET METHODES**

**6.3. Étude de la toxicité chez la souris Swiss.** La toxicité aiguë a été étudiée par injection des alcaloïdes ou leur mélange à la souris Swiss par voie intrapéritonéale (ip.). Les souris ont reçu  $10 \text{ ml.kg}^{-1}$  de solution isotonique (NaCl 0,9%) contenant une concentration donnée d'alcaloïde. L'étude s'est déroulée aux mêmes heures (14h-16h). La mortalité a été contrôlée jusqu'à 18 h et le lendemain matin par l'arrêt respiratoire et cardiaque. La toxicité chronique a été étudiée par voie ip. et par voie orale.

### **6.4. Étude de la biodisponibilité de la cotinine chez le rat Sprague Dawley.**

**6.4.1. Conditions expérimentales.** Chaque animal ne sert qu'une seule fois pour un temps ou une dose de drogue pour éviter l'accoutumance et le conditionnement. Chaque traitement est réalisé sur un lot de 5 rats dont trois serviront pour l'extraction de la cotinine et son dosage par HPLC et RIA. Les 2 autres rats serviront pour l'étude autoradiographique. Les rats ont été traités le matin vers 9-10 h. Les rats sont endormis par de l'éther anesthésique (GIFRER-BARBEZAT) dans une enceinte saturée. Le sang est prélevé par canulation de la carotide, recueilli dans des tubes héparinés (VACUTAINER BECTON-DICKINSON). Les rats sont ensuite sacrifiés par étirement spinal, les cerveaux prélevés, lavés dans une solution isotonique (NaCl 0,9%) et plongés environ 30 secondes dans de l'isopentane (SIGMA) maintenu à  $-35^{\circ}\text{C}$  par de l'azote liquide (Clarke) pour une congélation rapide qui permet d'éviter toute dégradation des tissus au cours de la congélation et la conservation à  $-20^{\circ}\text{C}$  (Herkenham & Pert).

#### **6.4.2. Étude du passage de la cotinine dans le système nerveux central (SNC) chez le rat.**

Les voies intra-péritonéale (ip.), sous-cutanée (sc.) et intra-veineuse (iv.) ont été testées. Trois temps 0-5 ; 20 et 60 min ont été testés par voie sc. Ces essais ont montré que les quantités de cotinine détectables dans le système nerveux central (SNC) sont supérieures par voie sc. et iv.



## MATERIELS ET METHODES

par rapport à la voie ip. et supérieures au temps 20 min par rapport aux temps 0-5 min. Les rats ont ensuite reçu trois doses de cotinine 1; 10 et 70 mg.kg<sup>-1</sup> par voie sc. et ont été sacrifiés au temps 20 min.

### **6.4.3. Effet des ligands nicotiniques sur la biodisponibilité de la cotinine chez le rat. Les**

rats ont reçu les drogues et les doses suivantes :

cotinine 1; 10 ou 70 mg.kg<sup>-1</sup> en coadministration avec la nicotine 0,1 mg.kg<sup>-1</sup>.

cotinine 70 mg.kg<sup>-1</sup> en coadministration avec la mécamylamine ou l'hexaméthonium (1 mg.kg<sup>-1</sup>).

Ces groupes ont été sacrifiés au temps 60 min.

**6.4.4. Extraction alcoolique de la cotinine.** Il s'agit d'extraire un composé polaire (la cotinine) d'un liquide physiologique (le plasma) ou d'un organe (le cerveau) en vue d'un dosage quantitatif radioimmunologique (RIA), chromatographique HPLC et une étude qualitative par chromatographie sur couche mince (CCM). On a donc appliqué la technique d'extraction par le méthanol qui a été rapportée pour l'extraction d'autres alcaloïdes comme la nicotine (Reavill et al., 1990).

- **Mode opératoire** : 1 g de cerveau est décongelé, homogénéisé au broyeur mécanique dans de l'eau distillée (0,5 ml) en présence de 10 µl de 2-phenylimidazole (ALDRICH) comme standard interne. Le volume est ajusté avec du méthanol (SIGMA) à 2,5 ml et agité mécaniquement au vortex. Après une centrifugation de 5 min à 4°C et 4000 rpm, le surnageant est transféré dans un tube à hémolyse. Le culot est lavé deux fois avec 1,25 ml de méthanol. Les surnageants sont transférés dans un tube à hémolyse et le volume final est de 5 ml. Le surnageant final est agité horizontalement au vortex équipé d'un plateau horizontal pendant environ 18 h avant une ultracentrifugation de 10 mn à 4°C et 105 000 g. Le sang

## MATERIELS ET METHODES

prélevé est centrifugé 10 mn à 4°C et 4000 rpm. 1 ml de plasma obtenu est ajusté à 5 ml avec du méthanol, agité au vortex sur un plateau horizontal pendant 30 min. Après une centrifugation de 10 min à 4°C et 4000 rpm, le surnageant est évaporé au rota vapeur sous pression réduite à 40°C et repris dans 400 µl d'urine humaine de non-fumeur.

**6.4.5. Dosage radioimmunologique (RIA) de la cotinine.** Le principe du dosage est fondé sur la compétition entre la cotinine et la cotinine marquée à l'iode 125 (*[125I]cotinine*) pour les mêmes sites anticorps (Ac1). Après une incubation pendant un temps donné, un second anticorps (Ac2), couplé au polyéthylène-glycol (PEG), permet, après incubation et centrifugation, la séparation de la cotinine fixée et de la cotinine libre. Le culot est séparé du surnageant par aspiration et compté. La concentration de cotinine de l'échantillon est lue par rapport à une courbe d'étalonnage. La radioactivité mesurée est inversement proportionnelle à la concentration de cotinine à doser.

**Mode opératoire :** la trousse est utilisée conformément aux instructions données par le fournisseur. Etant donné que cette trousse utilise une gamme d'étalonnage préparée dans l'urine, la cotinine extraite du cerveau et du plasma a été reprise dans l'urine de non-fumeur. Cette urine a été contrôlée pour les taux de cotinine naturellement détectés chez les non-fumeurs. De plus, des rats témoins, traités de la même manière, ont été inclus dans l'étude et un dosage HPLC a été réalisé chez les mêmes individus. Dans ce dosage HPLC les extraits alcooliques n'ont pas été repris dans l'urine. La concentration de la gamme d'étalonnage varie de 0 à 15 000 ng.ml<sup>-1</sup>. On incube 50 µl de standard, échantillon ou contrôle pendant 30 min avec 100 µl de *[125I]cotinine* et 100 µl d'antisérum polyclonal anti-cotinine (Ac1). On ajoute 1 ml de solution de précipitation contenant le second anticorps couplé au PEG (Ac2-PEG). On incube 10 min à température ambiante. Les échantillons sont centrifugés, la radioactivité du culot (*[125I]cotinine-Ac1-Ac2-PEG*) est comptée dans un compteur Gamma.

## MATERIELS ET METHODES

### **Caractéristiques de la trousse :**

- \_ Quantité de  $[^{125}I]$ cotinine livrée : 5,5  $\mu$  curies ( 204 Bq ) lyophilisée.
- \_ Activité spécifique : 3500 Ci.g<sup>-1</sup>.
- \_ Le lyophilisât est repris dans 10 ml d'eau distillée .
- \_ Activité au moment du marquage : 100000 cpm dans l'essai .
- \_ Maximum de liaison : 40 à 50 %.

### **6.4.6. Purification préliminaire de l'extrait alcoolique cérébral.** Cette purification a pour

but de rompre les liaisons cotinine-protéine gênantes pour la séparation de la cotinine sur couche mince et pour son dosage par HPLC. Pour séparer les alcaloïdes des autres constituants de l'extrait méthanolique, on les transforme en sels. Les alcaloïdes sont ensuite libérés sous forme de bases libres par l'ammoniac. A l'état de bases libres, ils vont être entraînés par le dichlorométhane.

**Mode opératoire :** 200  $\mu$ l (CCM) ou 4,5 ml (HPLC) de phase alcoolique ont été évaporés au rota vapeur sous pression réduite à 40°C. L'extrait sec est repris dans 0,5 ml d'HCl 5% (PROLABO). On agite pour reprendre la totalité du résidu. Dans une ampoule à décanter, la solution est alcalinisée avec 1 ml d'ammoniac 1 N (PROLABO) jusqu'à l'obtention d'un pH=9. On agite 2 fois le mélange avec à chaque fois 10 ml de dichlorométhane (PROLABO) pour entraîner la totalité des alcaloïdes. L'agitation doit se faire doucement et soigneusement pour éviter l'émulsion. Les phases organiques ont été recueillies par décantation et concentrées au rota vapeur à 40°C sous pression réduite jusqu'à l'obtention d'un résidu sec. Les résidus ont été repris dans 10  $\mu$ l d'éthanol 95% (SIGMA) pour la CCM ou dans 200  $\mu$ l de phase mobile pour l'HPLC. Les alcaloïdes résistent à une température de 100°C pendant 3 h. Ils ne sont pas détériorés par l'ammoniac. Le dichlorométhane permet de reprendre la majorité des composés polaires, cependant il peut rester des alcaloïdes dans la phase aqueuse. Dans

## **MATERIELS ET METHODES**

notre étude, les valeurs du dosage RIA permettront de savoir si des pertes significatives ont été subies au cours de cette purification.

**6.4.7. Identification de la cotinine par chromatographie sur couche mince.** La chromatographie sur couche mince est une méthode d'analyse rapide fondée sur la séparation des constituants d'un mélange par entraînement au moyen d'une phase mobile (le solvant) le long d'une phase stationnaire (la plaque). Une migration différentielle des solutés est obtenue par leur partition entre la phase mobile et la phase fixe. Chaque molécule du mélange à séparer est soumise à une force de rétention (affinité du soluté pour la phase fixe) et à une force de mobilité (entraînement par la phase mobile qui dépend de la solubilité de la molécule dans cette phase). Une chromatographie d'adsorption où la phase stationnaire est le gel de silice (gel de silice 0,25 mm avec indicateur de fluorescence) a été utilisée. Le gel de silice est un adsorbant fort avec une forte bipolarité électrique. L'adsorption est due à l'établissement de liaisons secondaires de surface entre l'adsorbant et la molécule adsorbée.

**Mode opératoire :** sur une plaque de silice on a déposé 5 fois 1  $\mu$ l des substances à séparer à 2 cm du bord inférieur et 1,5 cm des bords latéraux et avec un espacement de 1 cm entre les dépôts. Après séchage complet des dépôts, on a placé la plaque dans une cuve de développement saturée d'un mélange de solvants appropriés jusqu'à une hauteur de 1 cm environ. Quand le front du solvant a parcouru une distance suffisante, on retire la plaque en prenant soin de marquer le front de migration. On a laissé sécher la plaque à température ambiante.

**Identification de la cotinine :** on a identifié la cotinine sous lumière ultra violette (UV) à 254 nm par son Rf. Ensuite, on a coloré la plaque par le tétraiodobismuthate de potassium plus connu sous le nom de réactif de Dragendorff qui colore les alcaloïdes en orange.

**Le solvant de migration :** ce système ( 200 ml ) est constitué de



## MATERIELS ET METHODES

_ Sodium heptanesulfonate	1 mM (Sigma).
_ Acétonitrile	50 mL.L <sup>-1</sup> (Prolabo).
_ 2-phenylimidazole (standard interne)	1 µg (10 µl de 100 µg.mL <sup>-1</sup> )

Nous avons utilisé un détecteur UV à 260 nm et une gamme d'étalonnage constituée de 9 concentrations allant de 1 à 150 ng.mL<sup>-1</sup> réalisées dans de l'eau apyrogène. Le dosage RIA nous a permis d'estimer ces concentrations. La colonne est une Hypersil HPLC column (100 x 4,6 mm) BDS C18 3 µm (SHANDON HPLC). La boucle d'injection est de 20 µl. Le débit de la phase mobile est de 1,5 mL.min<sup>-1</sup>, le temps d'analyse est de 20 min et la pression de 175 bars. Le débit et la pression n'ont pas été strictement identiques pour tous les échantillons mais, le temps de rétention de la cotinine et son évolution au cours de la journée ont été contrôlés avec précision en début et en fin de manipulation.

**6.4.9. Induction de la tolérance chez le rat Sprague Dawley.** Les rats ont été gardés au moins trois jours pour leur adaptation à une température de 20 ± 2°C au rythme de la lumière naturelle et avaient libre accès à la nourriture (A04) et à l'eau. Les rats ont reçu au total 11, 22 ou 33 injections intrapéritonéales, 1 injection par jour pendant 3 jours puis 2 injections par jour pendant 4, 9 ou 15 jours. Les rats ont été sacrifiés par étirement spinal 48 heures après l'arrêt du traitement, sauf pour les animaux qui étaient prévus pour le Western blot.

**6.4.10. Préparation des membranes de poisson Torpedo.** Après avoir tué le poisson, les organes électriques sont récupérés, coupés en petits morceaux (environ 10 g), puis mis dans de l'azote liquide et enfin au congélateur à -80°C afin de les conserver. Les membranes de Torpedo ont été homogénéisées dans le tampon phosphate 50 mM à pH 7,4 et filtrées sur une gaze, avant de subir une centrifugation à 10 000 rpm, 20 min puis une ultracentrifugation à 22

## MATERIELS ET METHODES

000 rpm, 60 min. Les culots membranaires (microsomes) ont été congelés dans l'azote liquide et stockés à -80°C.

**6.4.11. Préparation des membranes de cerveau de rat Sprague Dawley.** Après avoir sacrifié les animaux par dislocation des vertèbres cervicales, les cerveaux ont été prélevés et rincés dans une solution isotonique de NaCl (0,9%) à 4°C. Les cerveaux entiers ou six régions cérébrales, obtenues par dissection grossière de 2 à 3 cerveaux, incluant le cortex, le cervelet, la medulla-oblongata (bulbe), le cerveau moyen (thalamus et hypothalamus), la caudate-putamen et l'hippocampe ont été homogénéisés à 4°C avec un homogénéiseur Polytron (5 fois 20 secondes) dans 10 volumes ( $\text{g.ml}^{-1}$ ) (cas des rats naïfs) ou 20 volumes (cas des rats tolérants) de tampon tris-HCl contenant les constituants suivants (mM) à pH 7,4 : Tris-HCl 50; NaCl 120; KCl 5;  $\text{CaCl}_2$  2;  $\text{MgCl}_2$  1 et azide de sodium (préservatif) 0,02%. L'homogénat a été centrifugé 10 min à 4°C à 105 000 g. Le culot membranaire a été remis en suspension et incubé dans un volume identique d'eau distillée 1 à 2 heures à 4°C pour enlever toute trace de ligand endogène (Bylund, 1992). Le culot d'une deuxième centrifugation identique a été réhomogénéisé dans le tampon tris-HCl à 4°C et centrifugé. Le culot final a été remis en suspension dans 10 volumes de tampon. Les membranes ont été stockées par fractions de 1,5 ml à -80°C jusqu'à leur utilisation. Dans ces conditions, les sites de la  $[125\text{I}]$ cotinine sont stables plus d'un an à -20 °C et plus de deux ans à -80 °C.

**6.4.12. Dosage des protéines.** Les protéines membranaires ont été dosées par la méthode de Bradford (Bradford, 1976) en utilisant le réactif coloré (bleu de coomassie). Dans ces conditions, la concentration en protéines est comprise entre 2 et 4  $\text{mg.ml}^{-1}$ . Les protéines solubilisées ont été précipitées à l'acide trichloroacétique (10%; 18h à 4°C) et dosées par la

## **MATERIELS ET METHODES**

méthode de Lowry (Microlowry test) à l'aide du réactif coloré (DC Protein Assay BIO-RAD). La sérum albumine bovine a été utilisée pour la courbe d'étalonnage.

### **6.4.13. Pureté des produits radioactifs.**

#### **6.4.13.a. *[125I]cotinine.***

Le produit radioactif lyophilisé est dissout dans 5 ml d'eau distillée et stocké à 4°C. Sa pureté est déterminée par chromatographie sur colonne de Séphadex G-25 M (PHARMACIA). Le volume mort de la colonne étant de 2,5 ml, nous avons déposé au sommet de cette colonne une solution de 200  $\mu$ l de *[125I]cotinine* et 2300  $\mu$ l d'eau distillée. Nous avons récolté des fractions de 500  $\mu$ l que nous avons compté (Compteur Gamma, PACKARD). Tous les résultats présentés ont été obtenus avec un radioligand dont la pureté est supérieure à 90%. La purification de ce radioligand (si nécessaire) a été développée au cours de ce travail. Dans ce cas, nous avons utilisé une colonne de silice et une élution par un gradient discontinu de méthanol-chloroforme allant de 0 à 10% de méthanol.

**6.4.13.b. *[125I]alpha-bungarotoxine (alpha-Bgt).*** La *[125I]alpha-Bgt* est conservée à 4°C diluée dans la BSA 0,1% et l'azide de sodium 0,02% à une concentration finale inférieure à 80 nM. Sa pureté est déterminée également par chromatographie sur colonne de Séphadex G-25 M. Sa pureté est supérieure à 90%. La purification de la *[125I] $\alpha$ -Bgt* (si nécessaire) a été réalisée par cette même colonne.

**6.4.13.c. *[3H]nicotine.*** La *[3H]nicotine* est stockée à -20°C dans l'éthanol (100%) à une concentration inférieure à 200 nM. Sa pureté a été estimée par chromatographie sur couche mince (CCM) sur plaque de silice en utilisant un mélange de solvants : chloroforme-méthanol-ammonium hydroxyde (9-1-0.1) comme éluant. Après avoir saturé la cuve avec ce



## **MATERIELS ET METHODES**

mélange, nous avons préparé la plaque CCM. Sur cette plaque, nous avons effectué un dépôt de 5  $\mu$ l de nicotine froide, servant de contrôle, et un dépôt voisin de 5  $\mu$ l de nicotine froide et 5  $\mu$ l de [ $^3$ H]nicotine. Après avoir séché ces dépôts au sèche-cheveux, nous avons introduit la plaque CCM dans la cuve où se fera la migration. La migration terminée (30-60 min), nous avons marqué le front de migration du solvant, nous avons séché la plaque et visualisé les tâches au fluorimètre à 250  $\mu$ m. Nous avons entouré au crayon les tâches obtenues pour la mesure de la distance de migration de chaque dépôt. Ces mesures faites, nous avons calculé le Rf qui est le rapport de la distance de migration du dépôt sur la distance de migration du solvant. La nicotine dans ce système a un Rf de  $0,7 \pm 0,1$ . Nous avons découpé la plaque CCM en portions identiques. Chaque portion a été comptée dans un pot à scintillation de 5 ml en présence de 4 ml de liquide à scintillation INSTA-GEL. Après comptage la pureté a été estimée par le rapport de la radioactivité (en cpm) de la tâche de la nicotine sur la somme de la radioactivité de la plaque. L'estimation donne une pureté supérieure à 87% après un an de stockage. La pureté des autres radioligands tritiés a également été contrôlée de manière identique suivant le solvant de migration préconisé par le fournisseur.

### **6.4.14. Interaction de la cotinine avec les sites de la [ $^{125}$ I] $\alpha$ -Bgt et de la [ $^3$ H]nicotine.**

En général pour les deux radioligands, les essais de compétition ont été réalisés en triplicata et les essais de saturation en quadruplicata pour la liaison totale (en absence d'inhibiteur) et en duplicata pour la liaison non spécifique (en présence d'inhibiteur). Le volume d'incubation était de 100  $\mu$ l à l'exception des expériences de saturation des sites de la [ $^3$ H]nicotine où il est de 500  $\mu$ l. Les filtres et la radioactivité totale ont été comptés directement dans les tubes à hémolyse pour la [ $^{125}$ I] $\alpha$ -Bgt (Compteur Gamma, PACKARD) ou dans 3 ml de liquide de scintillation (INSTA-GEL) pour la [ $^3$ H]nicotine (Compteur à Scintillation, BECKMAN).

## **MATERIELS ET METHODES**

### **6.4.14.a. [125I] $\alpha$ -Bungarotoxine.**

L'incubation se fait à 37°C pendant 2-3 h (Marks and Collins, 1982). La concentration en protéines est de 0,5 mg.ml<sup>-1</sup> en présence de BSA 1 mg.ml<sup>-1</sup>. La concentration du radioligand est fixe, 1-4 nM, dans les expériences de compétition et varie de 0,1 à 10 nM dans les expériences de saturation. La nicotine mM permet de déterminer la liaison non spécifique. L'incubation a été arrêtée par filtration sous vide et 4 lavages par 5 ml de tampon tris-HCl froid. Les filtres ont été préalablement trempés dans une solution de polyéthylèneimine 0,5 % pour réduire la liaison non spécifique sur les filtres.

### **6.4.14.b. [3H]nicotine.**

L'incubation se fait à 4°C pendant 90 min (Anderson and Arneric, 1994). La concentration en protéines est de 0,6 mg.ml<sup>-1</sup>, la concentration du radioligand est constante, 5-10 nM dans les expériences de compétition, et varie de 0,1 à 50 nM dans les expériences de saturation. La liaison non spécifique a été déterminée en utilisant la nicotine 10  $\mu$ M. L'incubation est arrêtée par filtration sous vide et 3 lavages par 5 ml de tampon tris-HCl froid. Les filtres sont préalablement trempés dans une solution de polyéthylèneimine 0,1 % pour réduire la liaison non spécifique sur les filtres.

### **6.4.15. Identification des sites de liaison de la [125I]cotine.**

Toutes les expériences de cinétique et de compétition ont été réalisées en triplicata dans un volume de 100  $\mu$ l à une concentration fixe du radioligand 67 pM et de protéines 1 mg.ml<sup>-1</sup>. L'incubation a été réalisée dans un tube à hémolyse à 4°C ou à température ambiante (RT). Toutes les expériences de saturation ont été réalisées en quadruplicata dans un volume de 250  $\mu$ l, la concentration du radioligand varie de 10 à 600 pM. La concentration en protéines est de 0,25-5 mg.ml<sup>-1</sup>. La radioactivité a été comptée directement dans des tubes à hémolyse

## **MATERIELS ET METHODES**

(Compteur Gamma PACKARD). Les incubations ont été arrêtées par filtration sous vide et 3 lavages par 5 ml de tampon tris-HCl froid. Les filtres en fibre de verre de type GF/B ont été trempés dans le même tampon. Généralement, une concentration 1 à 10 mM de l'inhibiteur a été testée. Les inhibiteurs sélectionnés ont été utilisés à des concentrations plus faibles pour définir la concentration inhibant 50% de la liaison du radioligand ( $IC_{50}$ ) (Cheng and Prusoff, 1973).

### **6.4.16. Études autoradiographiques**

**6.4.16.a. Conditionnement des cerveaux.** Les rats sont sacrifiés par étirement spinal (rats naïfs et rats tolérants) ou anesthésiés par du chloroforme (voir étude de la biodisponibilité de la cotinine chez le rat). Les cerveaux ont été prélevés rapidement et lavés dans une solution isotonique (NaCl 0,9%) à 4°C, puis plongés dans de l'isopentane maintenu à -35°C par de l'azote liquide (Herkenham and Pert, 1982). Des coupes rostro-caudales ou sagittales ont été obtenues au cryostat (tissue TEK II MILES) thermostaté à -15°C. Les coupes ont été montées sur des lames gélatinées. Les lames ont été gélatinées par 3 trempages dans 500 ml d'eau contenant 5 g de gélatine et 0,25 g de chrome d'alun à 50°C et séchées à l'air une nuit. Les coupes ont été placées une nuit au dessiccateur à 4°C et peuvent être stockées à -80°C, dans un dessiccateur, pendant plus de 24 heures (Clarke et al., 1984; Clarke et al., 1985).

**6.4.16.b. Préincubation.** Cette étape est nécessaire pour la  $[125I]alpha\text{-Bgt}$  mais n'est pas nécessaire pour la  $[3H]nicotine$  (Clarke et al., 1985) et la  $[125I]cotinine$ . Les coupes sont préincubées 30 min à température ambiante avec de la BSA  $1\text{ mg.ml}^{-1}$  en absence (liaison totale) ou en présence de nicotine 1 mM (liaison non spécifique) ou cotinine 1 mM ou  $1\text{ }\mu\text{M}$ .

## **MATERIELS ET METHODES**

**6.4.16.c. Incubation.** Les coupes sont incubées 2 h avec la  $[125I]\alpha\text{-Bgt}$ , 20 min avec la  $[3H]\text{nicotine}$  à température ambiante ou 60 min à 4°C avec la  $[125I]\text{cotinine}$ , en présence (liaison non spécifique LNS) ou non (liaison totale, LT) de l'inhibiteur pour la définition de la LNS. La différence entre la LT et la LNS permet d'obtenir la liaison spécifique du radioligand. La LNS a été définie en présence de nicotine mM ( $[125I]\alpha\text{-Bgt}$ ) ou 10  $\mu\text{M}$  ( $[3H]\text{nicotine}$ ) (Clarke et al., 1985). Pour la  $[125I]\text{cotinine}$ , la LNS est déterminée avec la nicotine ou la cotinine 1 mM.

**6.4.16.d. Arrêt de l'incubation.** Les coupes ont été lavées 4 fois pendant 30 s ( $[3H]\text{nicotine}$  et  $[125I]\text{cotinine}$ ) ou 6 fois pendant 30 min ( $[125I]\alpha\text{-Bgt}$ ) dans 500 ml de tampon tris-HCl 50 mM ( $[125I]\alpha\text{Bgt}$ ) ou 500 ml de tampon tris-HCl contenant du  $\text{CaCl}_2$  5 mM ( $[3H]\text{nicotine}$  et  $[125I]\text{cotinine}$ ), séchées sous un filet d'air frais, puis stockées 24 heures dans un dessiccateur, afin d'éliminer toute trace d'humidité sur les coupes.

**6.4.16.e. Exposition et développement.** Les coupes sont alors placées (pour obtenir des images) ou non (pour quantification rapide) sous film autoradiographique (X-OMAT AR, KODAK) en présence d'étalons radioactifs (microscales, AMERSHAM) et exposées dans des cassettes à rayons X (KODAK) pendant 12-14 semaines à -80°C ( $[3H]\text{nicotine}$ ) ou 2-5 semaines à température ambiante ( $[125I]\alpha\text{-Bgt}$  et  $[125I]\text{cotinine}$ ). Les films sont alors développés automatiquement dans un développeur RX-XP 505 (3M) ou manuellement (Clarke et al., 1985).

**6.4.16.f. Quantification.** Les autoradiogrammes ainsi obtenus sont alors quantifiés par densitométrie, grâce aux étalons et un analyseur d'images BIOCROM (version 1.50 b). Lorsque les coupes sont destinées à la quantification rapide, elles sont grattées et récupérées dans des

## **MATERIELS ET METHODES**

tubes à hémolyse ( $[125I]$ cotinine et  $[125I]\alpha$ -Bgt) ou dans des flacons à scintillation ( $[3H]$ nicotine) et comptées (Clarke et al., 1985).

### **6.4.17. Purification des sites de la cotinine**

**6.4.17.a. Solubilisation des sites de la  $[125I]$ cotinine.** Toutes les étapes sont réalisées à 4°C. Les cerveaux de 5 rats mâles (sacrifiés par étirement spinal) sont prélevés rapidement, lavés dans du NaCl 0,9%, puis homogénéisés dans 10 ml.g<sup>-1</sup> de cerveau dans le tampon Tris-HCl 50 mM (pH 7,4). L'homogénat est centrifugé à 45 000 g pendant 10 min et le culot est soumis à la même opération. Le culot final est mis à incuber 90 min sous agitation dans 100 ml de tampon tris 50 mM, PMSF 1 mM, EGTA 1 mM, CHAPS 10 mM. Une dernière centrifugation de 30 min à 40 000 g est réalisée et le surnageant final est récupéré.

**6.4.17.b. Enlèvement du CHAPS par l'adsorbant Bio-Beads SM-2.** La concentration de CHAPS 10 mM est supérieure à la concentration micellaire critique (CMC). Le détergent a été enlevé par adsorption sur des billes de Bio-Beads suivant le protocole de Holloway (Holloway, 1973). Les billes sont mises en solution avec le tampon Tris-HCl pH=7,4, sous agitation et dégazées. On décante l'excès de solvant, et on ajoute 20 g de billes mouillées aux 100 ml de protéines solubilisées. On laisse incuber sous agitation à 4°C pendant une nuit. La solution de protéines est récupérée par filtration.

**6.4.17.c. Synthèse de la N,n-propyl carboxamide cotinine.** La carboxycotinine 2,3 mmole, la propylamine 3,4 mmole et 1,3 dicyclohexylcarbodiimide 2,5 mmole sont incubés dans 20 ml diméthylformamide à température ambiante pendant 4 heures sous agitation dans un ballon fermé. Le précipité est filtré sur filtre Wathman (GF/B). Plusieurs précipitations avec des solvants organiques (chloroforme, éther...) ont été réalisées.

## MATERIELS ET METHODES

**6.4.17.e. Vérification du produit de synthèse.** L'analyse CCM (plaque de silice; méthanol/chloroforme 10%-90%) a montré 2 produits de synthèse majoritaires (Rf 1=0,59 et Rf 2=0,71), un 3<sup>ème</sup> produit, en très faible quantité, (Rf 3=0,91) et la carboxycotinine (Rf=0,15). Une colonne de silice a été utilisée pour séparer ces 4 produits sur un gradient discontinu de méthanol/chloroforme allant de 0% à 10% méthanol. La structure de la N,n-propyl-carboxamide cotinine (supposée être le produit de Rf 2=0,71) a été obtenue par IR (avec le Nujol), et RMN du <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C (avec du chloroforme deutéré CDCl<sub>3</sub>).

**6.4.17.f. Utilisation de la carboxycotinine pour la préparation de la colonne d'affinité.** A partir de 15 ml de gel EAH Sépharose 4B lavé par 80 ml de NaCl 0,5 M par ml de gel, on fait le couplage entre la carboxycotinine en excès (20 fois la concentration du bras espaceur) et le gel. La carbodiimide (0,1 M) permet la formation de liaison amide entre la fonction carboxylique du ligand et la fonction amine portée par le bras espaceur du gel. La réaction a été faite pendant 24 heures sous agitation, à température ambiante. L'excès de ligand est éliminé par trois lavages successifs en alternant 100 ml de tampon acétate 100 mM ; NaCl 500 mM (pH 4) et du tampon tris-HCl 100 mM ; NaCl 500 mM (pH 8,3) (PHARMACIA). Le gel est alors dégazé et placé dans la colonne puis tassé avec un flux de 0,6 ml.min<sup>-1</sup> en évitant la formation de bulles d'air. Il est conservé à 4°C dans l'éthanol (20 %).

### **6.4.17.g. Purification par chromatographie d'affinité.**

**Premier tour de colonne.** Les protéines solubilisées (100 ml) sont concentrées dix fois par dialyse de flux dans des membranes de dialyse ou "boudins" (SPECTRAPOR seuil de coupure : 6 000-8 000). 1,6 ml du matériel concentré (20 mg protéines) est déposé sur la colonne et élué par 10 fois 5 ml de tampon Tris-HCl 50 mM CHAPS 1mM (pH 7,5) (Fractions de 1 à 10), 10 fois 5 ml de même tampon contenant de la cotinine 1mM (Fractions

## MATERIELS ET METHODES

de 11 à 20), 10 fois 5 ml de même tampon contenant 0,2 M NaCl (Fractions de 21 à 30). La colonne est ensuite lavée par 100 ml de tampon d'élution. La colonne est régénérée par 3 lavages alternatifs par les deux tampons à haut et à bas pH utilisés lors de la synthèse de la colonne (tampon acétate et tris-HCl). Finalement le gel est rééquilibré dans le tampon d'élution et conservé à 4°C en présence d'éthanol (20 %) (PHARMACIA).

Les fractions de 5 ml sont recueillies avec un flux de 0,4 ml.min<sup>-1</sup> (67 % flux du tassement) à l'aide d'une pompe péristaltique (GILSON). On mesure la concentration en protéines de chaque fraction par la méthode de Lowry (Microlowry test), sensible pour de faibles concentrations en protéines. La gamme étalon est réalisée avec de la sérum albumine bovine (SAB).

Les protéines des fractions 11 à 20 obtenues lors du premier tour de colonne sont d'abord précipitées pour pouvoir être dosées. 2 ml de chaque fraction sont précipités par incubation avec de l'acide trichloro-acétique (TCA) 10% pendant 48 h , puis centrifugés à 15 000 g (toutes les étapes sont faites à 4°C). Après 3 lavages du culot avec de l'éther-éthanol (1-2 v/v) et aspiration, le culot est repris dans 200 µl de tampon tris-HCl 50 mM; CHAPS 1mM; pH=7,5.

**Deuxième tour de colonne.** 5 passages par la colonne d'affinité (premier tour) ont été réalisés. Les fractions 11 à 20, de 4 de ces 5 passages ont été concentrées par dialyse de flux à 4°C et dialysées contre 5 litres d'eau distillée (12 heures) (4 changements). Le matériel est ensuite lyophilisé et repris dans 2 ml de tampon d'élution. 1,6 ml ont été repassés par colonne (deuxième tour) et ont subi les mêmes opérations décrites lors du premier tour. Les fractions 11 à 20, éluées par la cotinine 1 mM au second tour, ont été concentrées, dialysées, lyophilisées et stockées à -20°C jusqu'à l'analyse SDS-PAGE.

## **MATERIELS ET METHODES**

**6.4.18 Production des anticorps anti-récepteurs de la cotinine.** Nous avons injecté en primovaccination 20  $\mu\text{g}$  des protéines isolées par chromatographie d'affinité dans le muscle de la cuisse de la souris dans l'adjuvant complet de Freud. 2-3 autres vaccinations ont été faites avec des quantités plus faibles de protéines (environ 5  $\mu\text{g}$ ) dans l'adjuvant incomplet de Freud et espacées par 1 mois. Les sérums ont été récupérés au niveau de la veine caudale au 7<sup>ème</sup> jour après chaque vaccination pour suivre la production des anticorps.

**6.4.19 Analyse par SDS-PAGE et par Western blot.** Le matériel lyophilisé des protéines du deuxième tour ainsi que les protéines de départ et du premier tour a été analysé par SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) selon Laemli (Laemmli, 1970). Les échantillons sont préparés dans le tampon de dépôt (80 mM Tris-HCl, pH=6,8 ; 10% glycérol; 0,02% Bleu de bromophénol; 2% SDS) et soumis à électrophorèse dans un gel de polyacrylamide à 12% (25 V 30 minutes et 30 V 2 h 30 min). Après migration, le gel est coloré par le bleu de Coomassie ou par le nitrate d'argent.

Pour les expériences de Western blot, les animaux sont sacrifiés directement après l'arrêt du traitement. Les tissus sont mis en suspension grâce au tampon Tris-HCl pH7,6 0,01M ; NaCl 0,1 M ; EDTA 0,001 M pH8 ; aprotinine 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; PMSF 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . On ajoute ensuite le même volume du tampon de dépôt des protéines 2 X. Les échantillons sont ensuite bouillis 10 min et soniqué aux maximum 2 min. Ils sont centrifugés à 10000 g 10 min et le surnageant conservé à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Après SDS-PAGE, les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose et les membranes sont ensuite saturées, lavées, incubées avec le sérum et révélées.

**6.4.20. Criblage immunologique.** Les bactéries sont préparées et incubées avec le phage, mélangées au soft Agar (Agarose) puis étalées sur boîte d'Agar. Elles sont incubées à  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$



## MATERIELS ET METHODES

pour induire le cycle lytique du phage pendant 2h 30 min. Un Filtre de nitrocellulose imbibé d'inducteur de la  $\beta$ -galactosidase et non dégradable l'IPTG est soigneusement déposé sur la culture. Les boîtes sont transférées à 37 °C pendant 4 heures. Les filtres sont récupérés, après orientation par rapport à la boîte pour pouvoir retrouver précisément la plage de lyse qui a produit la réaction immunologique. Le filtre est ensuite traité comme lors d'un Western blot (sauf qu'il n'y a pas eu de SDS-PAGE). Le signal est localisé et le phage repris pour subir un 2<sup>ème</sup> et un 3<sup>ème</sup> si nécessaire jusqu'à obtention d'un clone pur. Généralement un deuxième tour est suffisant, car au 2<sup>ème</sup> tour on étale 1-10 clone par cm<sup>2</sup> et le repiquage est facile à réaliser.

**6.4.21. Préparation du clone.** Nous avons utilisé deux méthodes suivant le cas. Le phage  $\lambda$ gt11 a été préparé en milieu solide pour obtenir suffisamment d'ADN à l'excision. L'insert a été obtenu et cloné dans le plasmide BS (Blue Script) pour le séquençage et l'analyse par les enzymes de restriction. Le phage ZAPExpress a été excisé *in vivo*, car ce phage peut être converti en plasmide *in vivo*.

**6.4.22. Étude comportementales.** Les effets de l'administration de la nicotine et de la cotinine ont été étudiés chez la souris *Mus musculus*. Les alcaloïdes ont été mis en solution fraîche tous les soirs dans l'eau de boisson et présentés *ad libitum* comme seule source d'eau (accès imposé) ou en présence d'une seconde source d'eau (accès choix). L'eau sert de contrôle aux effets des alcaloïdes. La croissance pondérale a été suivie par pesée tous les 3-4 jours et constitue par conséquent une habitude des animaux aux stress de la manipulation par l'expérimentateur, préalable à la mesure de l'activité openfield.

L'activité openfield a été mesurée dans un champ ouvert de 60 cm de diamètre, sur un fond blanc marqué de case pour étudier les effets moteurs par dénombrement.

## **MATERIELS ET METHODES**

Toutes les observations ont été effectuées entre 9 et 13 heures dans une salle d'expérimentation calme. Chaque animal a été déposé au centre du champ et retiré au bout de 3 min. Certains groupes ont été évalués à deux reprises séparées par un intervalle de temps de 4 ou 7 jours.

Les effets sur le déplacement dans le centre du champ mesure les effets moteur-émotionnels (ME). Dans la périphérie du champ les effets moteurs (M). Le nombre de redressement sur les pattes postérieures sans appui sur la paroi l'exploration distale (Rearing ED). Le nombre de redressement avec appui sur la paroi l'exploration proximale (EP). Les effets sur les réactions de toilettes (AT) et les défécations (AE) mesurent l'anxiété.

Les effets sur l'analgésie d'origine spinale ont été mesurés par le test du retrait de la queue grâce à un appareil 'tail-flick' APPELEX (FRANCE).

**6.4.21. Analyse des données.** Les données de la toxicité chez l'insecte et chez la souris ont été exprimées en fraction survivante. Chez les insectes, le logarithme de la fraction survivante a été utilisé pour la linéarisation (Steel and Peckham, 1979). Les données ont été analysées par deux méthodes :

### **Méthode de Wadley (Wadley, 1945).**

A- Phase préliminaire. Elle consiste en l'établissement des courbes dose-effet des produits à étudier. On considère deux produits Pa et Pb pour lesquels on a tracé les courbes dose-effet. On calcule ensuite l'activité (insecticide) relative (A.I.R) par la formule:

$$B- A.I.R = (DL_{50}Pa/DL_{50}Pb + DL_{90}Pa/DL_{90}Pb)/2.$$

## MATERIELS ET METHODES

C- Mise en évidence de la synergie. On fait plusieurs mélanges de Pa et Pb qui diffèrent par les concentrations utilisées. On va convertir la doses de Pb en doses de Pa par le calcul suivant :

$$D- \text{dose Pa} = \text{dose Pb} \times \text{A.I.R}$$

Ainsi on peut calculer la dose totale de Pa dans le mélange. Dès lors on peut calculer le pourcentage de mortalité théorique du mélange. Ceci suggère que l'effet est dû à la simple somme des deux produits Pa et Pb. Par l'expérimentation, si la mortalité engendrée par le mélange est supérieure à la mortalité théorique, on peut conclure qu'il y a synergie (interaction supra-additive) dans l'effet des Pa et Pb. Si la mortalité expérimentale n'est pas différente de la mortalité théorique, on dit qu'il y a addition des effets de Pa et Pb (pas de synergie). Si la mortalité expérimentale est inférieure à la mortalité théorique, on dit qu'il y a interaction antagoniste dans l'effet des Pa et Pb.

**Méthode de Steel et Peckham (Steel and Peckham, 1979).** Il est très difficile d'additionner de façon simple deux effets (exemple les rayons de deux sphères ne s'additionnent pas de façon simple). De plus, cette méthode n'intègre dans son analyse que les doses actives des produits.

Si les courbes dose-effet sont linéaires on obtient un isobologramme linéaire.

Si les courbes dose-effet ne sont pas linéaires, le calcul du mode I et du mode II permet de tracer une enveloppe dite d'additivité.

Toutes les itérations ont été réalisées dans le programme Enzfitter de régression non-linéaire (Leatherbarrow, 1987) comparable au programme Ligand de Munson et Rodbard (Munson and Rodbard, 1980).

## MATERIELS ET METHODES

Dans les cas d'un modèle apparent à un site, les  $IC_{50}$  ont été estimés graphiquement (Cheng and Prusoff, 1973). Les données de compétition ont été, parfois, transformées en saturation et les constantes de dissociation, ( $K_d$ ) du ligand froid ont été estimées par itération. Dans cette transformation, le lié (B) = inhibition (en % ou en fmole.mg<sup>-1</sup> protéine) et le libre (F) = concentration de l'inhibiteur (Bylund, 1986).

La méthode de Swillens (Swillens, 1992) permet une détermination directe de la concentration totale en récepteurs ( $B_{max}$ ) à partir d'une courbe d'inhibition compétitive homologue par :  $B_{max} = IC_{50} \times B_{s,o} / L$  avec  $B_{s,o} = B_{t,o} - \alpha L$  où  $B_{t,o}$  est la liaison totale,  $\alpha$  le taux de liaison non spécifique et L la concentration du radioligand.

Les données d'électrophorèse et de Western blot ont été quantifiées par densimétrie pour obtenir l'aire sous la courbe (AUC) ou la hauteur du pic.

### **6.4.22. Statistique.**

Les données de toxicité aiguë ont été testées par la loi normale (si  $np$  et  $n(p-1) \geq 5$ ) ou directement comparées dans la Table de Mainland, Herrera et Sutcliffe (si  $np$  ou  $n(p-1) < 5$  ( $n$  est égal au nombre d'individu et  $p$  à la fraction survivante)).

Les données de la biodisponibilité, de la peroxydation lipidique, de la psychomotricité (champ openfield), des gels, Western Blot etc ont été analysées par ANOVA (analyse de variance) une, deux ou trois voies selon les cas. Les comparaisons sont généralement faites au seuil de Scheffé ( $S_{\alpha}^2 = (a-1)F_{(a-1; n-a; \alpha)}$ ,  $a$  est le nombre de groupe).

L'homogénéité des variances a été jugée par les tests de Cochran ( $S_{max}^2 / \sum S_i^2$ ) ou Hartley ( $S_{max}^2 / S_{min}^2$ ). La normalité a été jugée par le test rapide de Davis (E/s).

Dans les études de liaison des radioligands (compétition et saturation) et de biodisponibilité, le modèle complexe est acceptable lorsqu'il réduit significativement le  $\chi^2$ . Le  $t$  est dans ce cas calculé par le rapport  $\chi^2$  du modèle simple sur  $\chi^2$  du modèle complexe et testé dans la table du  $t$ .

## **RÉFÉRENCES**

- Alinger NL (1977) Conformational analysis. 130. MM2. A hydrocarbon force field utilizing V1 and V2 torsional terms. *J Am Chem Soc* 99:8127-8134.
- Alkondon M, Albuquerque EX (1993) Diversity of nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal neurons. I Pharmacological and functional evidence for distinct structural subtype. *J Pharmacol Exp Ther* 265:1455-1473.
- Anderson DJ, Arneric SP (1994) Nicotinic receptor binding of [<sup>3</sup>H]cytisine, [<sup>3</sup>H]nicotine and [<sup>3</sup>H]methylcarbamylcholine in rat brain. *Eur J Pharmacol* 253:261-267.
- Andersson K, Jansson A, Kuylenstierna F, Eneroth P (1993) Nicotine and its major metabolite cotinine have different effects on aldosterone and prolactin serum levels in the normal male rat. *Eur J Pharmacol* 228:305-312.
- Armitage AK, Hall GH, Morrison CF (1968) Pharmacological basis for the tobacco smoking habit. *Nature* 217:331-334.
- Arqueros L, Naquira D, Zunino E (1978) Nicotine-induced release of catecholamines from rat hippocampus and striatum. *Biochem Pharmacol* 27:2667-2674.
- Balfour DJ (1980) Studies on the biochemical and behavioural effects of oral nicotine. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 245:95-103.
- Balfour DJ, Fagerstrom KO (1996) Pharmacology of nicotine and its therapeutic use in smoking cessation and neurodegenerative disorders. *Pharmacol Ther* 72:51-81.
- Barrass BC, Blackburn JW, Brimblecombe RW, Rich P (1969) Modification of nicotine toxicity by pretreatment with different drugs. *Biochem Pharmacol* 18:2145-2152.
- Baumeister RF, Heatherton DM (1994) *Loosing control: how and why people fail at self-regulation*. San Diego: Academic press.
- Benowitz NL (1996) Pharmacology of nicotine: addiction and therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36:597-613.
- Benowitz NL (1999) Nicotine addiction. *Prim Care* 26:611-631.
- Benowitz NL, Kuyt F, Jacob P, 3rd, Jones RT, Osman AL (1983) Cotinine disposition and effects. *Clin Pharmacol Ther* 34:604-611.
- Benowitz NL, Sharp DS (1989) Inverse relation between serum cotinine concentration and blood pressure in cigarette smokers. *Circulation* 80:1309-1312.
- Berridge KC (1996) Food reward: brain substrates of wanting and liking. *Neurosci Biobehav Rev* 20:1-25.
- Berridge KC, Robinson TE (1998) What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Res Brain Res Rev* 28:309-369.

- Bertolucci-D'Angio M, Serrano A, Scatton B (1990) Mesocorticolimbic dopaminergic systems and emotional states. *J Neurosci Methods* 34:135-142.
- Binette JP, Binette MB (1994) Sequencing proteins extracted from stones. *Scanning Microscopy* 8:233-239.
- Binko J, Murphy TV, Majewski H (1998) 17Beta-oestradiol enhances nitric oxide synthase activity in endothelium-denuded rat aorta. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 25:120-127.
- Blantz RC, Deng A, Lortie M, Munger K, Vallon V, Gabbai FB, Thomson SC (2002) The complex role of nitric oxide in the regulation of glomerular ultrafiltration. *Kidney Int* 61:782-785.
- Borsini F, Bendotti C, Przewlocka B, Samanin R (1983) Monoamine involvement in the overeating caused by muscimol injection in the rat nucleus raphe dorsalis and the effects of d-fenfluramine and d-amphetamine. *Eur J Pharmacol* 94:109-115.
- Borzelleca JF, Bowman ER, McKennis H, Jr. (1962) Studies on the respiratory and cardiovascular effects of (-)cotinine. *J Pharmacol Exp Ther* 127:92-95.
- Bowman ER, McKennis H, Jr. (1963) (-)Cotinine preparation. *Biochem prep* 10:36-39.
- Bowman ER, Turnbull LB, McKennis H, Jr. (1959) Metabolism of nicotine in the human and excretion of pyridine compounds by smokers. *J Pharmacol Exp Ther* 127:92-95.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Brioni JD, Decker MW, Sullivan JP, Arneric SP (1997) The pharmacology of (-)-nicotine and novel cholinergic channel modulators. *Adv Pharmacol* 37:153-214.
- Brioni JD, O'Neill AB, Kim DJB, Decker MW (1993) Nicotinic receptor agonists exhibit anxiolytic-like effects on the elevated plus-maze test. *Eur J Pharmacol* 238:1-8.
- Bruniquel D, Dousset JC, Courriere P, Fourasté I (1992) Synergy between cotinine and nicotine in their insecticidal activity. *Med Sci Res* 20:869-870.
- Bush D, Fritz H, Knight C, Mount J, Scott K (1998) A hirudin-sensitive, growth-related proteinase from human fibroblasts. *Biol Chem* 379:225-229.
- Bylund DB (1986) Graphic presentation and analysis of inhibition data from ligand-binding experiments. *Anal Biochem* 159:50-57.
- Bylund DB (1992) A practical guide for receptor binding. In: pp 19-21: Du pont Biotech Update.
- Carty CS, Huribal M, Marsan BU, Ricotta JJ, Dryjski M (1997) Nicotine and its metabolite cotinine are mitogenic for human vascular smooth muscle cells. *J Vasc Surg* 25:682-688.
- Carty CS, Soloway PD, Kayastha S, Bauer J, Marsan B, Ricotta JJ, Dryjski M (1996) Nicotine and cotinine stimulate secretion of basic fibroblast growth factor and affect expression of matrix

- metalloproteinases in cultured human smooth muscle cells. *J Vasc Surg* 24:927-934; discussion 934-925.
- Chahine R, Aftimos G, Wainberg MC, Navarro-Delmasure C, Abou Khalil A, Chahboun B (1996) Cotinine modulate the cardiovascular effet of nicotine. *Med Sci Res* 24:21-23.
- Chahine R, Calderone A, Navarro-Delmasure C (1990) The in vitro effects of nicotine and cotinine on prostacyclin and thromboxane biosynthesis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 40:261-266.
- Chahine R, Navarro-Delmasure C, Chahn PH, Abou Assali M, Kaltoum E (1993) Effects of nicotine and cotinine on noradrenergic transmission in the heart. *Med Sci Res* 21:421-422.
- Chalon S, Moreno H, Jr., Benowitz NL, Hoffman BB, Blaschke TF (2000) Nicotine impairs endothelium-dependent dilatation in human veins in vivo. *Clin Pharmacol Ther* 67:391-397.
- Cheng Y, Prusoff WH (1973) Relationship between the inhibition constant (K1) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 22:3099-3108.
- Clarke PB (1987) Nicotine and smoking: a perspective from animal studies. *Psychopharmacology* 92:135-143.
- Clarke PB (1990) Dopaminergic mechanisms in the locomotor stimulant effects of nicotine. *Biochem Pharmacol* 40:1427-1432.
- Clarke PB, Fibiger HC (1987) Apparent absence of nicotine-induced conditioned place preference in rats. *Psychopharmacology* 92:84-88.
- Clarke PB, Kumar R (1984) Effects of nicotine and d-amphetamine on intracranial self-stimulation in a shuttle box test in rats. *Psychopharmacology* 84:109-114.
- Clarke PB, Pert CB, Pert A (1984) Autoradiographic distribution of nicotine receptors in rat brain. *Brain Res* 323:390-395.
- Clarke PB, Reuben M (1996) Release of [3H]-noradrenaline from rat hippocampal synaptosomes by nicotine: mediation by different nicotinic receptor subtypes from striatal [3H]-dopamine release. *Br J Pharmacol* 117:595-606.
- Clarke PB, Schwartz RD, Paul SM, Pert CB, Pert A (1985) Nicotinic binding in rat brain: autoradiographic comparison of [3H]acetylcholine, [3H]nicotine, and [125I]-alpha-bungarotoxin. *J Neurosci* 5:1307-1315.
- Commandeur JN, Vermeulen NP (1990) Molecular and biochemical mechanisms of chemically induced nephrotoxicity: a review. *Chem Res Toxicol* 3:171-194.
- Conklin BS, Surowiec SM, Ren Z, Li JS, Zhong DS, Lumsden AB, Chen C (2001) Effects of nicotine and cotinine on porcine arterial endothelial cell function. *J Surg Res* 95:23-31.



- Corrigall WA, Coen KM (1989) Fixed-interval schedules for drug self-administration in the rat. *Psychopharmacology* 99:136-139.
- Corrigall WA, Franklin KB, Coen KM, Clarke PB (1992) The mesolimbic dopaminergic system is implicated in the reinforcing effects of nicotine. *Psychopharmacology* 107:285-289.
- Court JA, Lloyd S, Thomas N, Piggott MA, Marshall EF, Morris CM, Lamb H, Perry RH, Johnson M, Perry EK (1998) Dopamine and nicotinic receptor binding and the levels of dopamine and homovanillic acid in human brain related to tobacco use. *Neuroscience* 87:63-78.
- Cox BM, Goldstein A, Nelson WT (1984) Nicotine self-administration in rats. *Br J Pharmacol* 83:49-55.
- Crain WO, Jr., Wildman WC, Roberts JD (1971) Nuclear magnetic resonance spectroscopy. Carbon-13 spectra of nicotine, quinine, and some Amaryllidaceae alkaloids. *J Am Chem Soc* 93:990-994.
- Creese I, Sibley DR (1981) Receptor adaptations to centrally acting drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 21:357-391.
- Dagne E, Castagnoli N, Jr. (1972) Cotinine N-oxide, a new metabolite of nicotine. *J Med Chem* 15:840-841.
- Dambisya YM, Lee TL (1996) Role of nitric oxide in the induction and expression of morphine tolerance and dependence in mice. *Br J Pharmacol* 117:914-918.
- Dar MS, Bowman ER, Li C (1994) Intracerebellar nicotinic-cholinergic participation in the cerebellar adenosinergic modulation of ethanol-induced motor incoordination in mice. *Brain Res* 644:117-127.
- Dar MS, Li C, Bowman ER (1993) Central behavioral interactions between ethanol, (-)-nicotine, and (-)-cotinine in mice. *Brain Res Bull* 32:23-28.
- Dawson DA, Fort DJ, Smith GJ, Newell DL, Bantle JA (1988) Evaluation of the developmental toxicity of nicotine and cotinine with frog embryo teratogenesis assay: *Xenopus*. *Teratog Carcinog Mutagen* 8:329-338.
- Dewar MJS, Zoebisch EG, Healy EF, Stewart JJP (1985) AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model. *J Am Chem Soc* 107:3902-3909.
- Di Giusto E, Eckhard I (1986) Some properties of saliva cotinine measurements in indicating exposure to tobacco smoking. *Am J Public Health* 76:1245-1246.
- Dominiak P, Fuchs G, von Toth S, Grobecker H (1985) Effects of nicotine and its major metabolites on blood pressure in anaesthetized rats. *Klin Wochenschr* 63:90-92.

- Donny EC, Caggiula AR, Mielke MM, Jacobs KS, Rose C, Sved AF (1998) Acquisition of nicotine self-administration in rats: the effects of dose, feeding schedule, and drug contingency. *Psychopharmacology (Berl)* 136:83-90.
- Doré S (2002) Decreased activity of the antioxidant heme oxygenase enzyme: implications in ischemia and in alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 32:1276-1282.
- Dvoskin LP, Teng L, Buxton ST, Crooks PA (1999) (S)-(-)-cotinine, the major brain metabolite of nicotine, stimulates nicotinic acetylcholine receptors to evoke [<sup>3</sup>H]dopamine release from striatal slices in a calcium-dependent manner. *J Pharmacol Exp Ther* 288:905-911.
- el-Bizri H, Clarke PB (1994) Blockade of nicotinic receptor-mediated release of dopamine from striatal synaptosomes by chlorisondamine and other nicotinic antagonists administered in vitro. *Br J Pharmacol* 111:406-413.
- Eliakim R, Fan QX, Babyatsky MW (2002) Chronic nicotine administration differentially alters jejunal and colonic inflammation in interleukin-10 deficient mice. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 14:607-614.
- Erenmemisoglu A, Tekol Y (1994) Do nicotine metabolites have an effect on pain perception? Antinociceptive effect of cotinine in mice. *Pharmazie* 49:374-375.
- Etscorn F, Moore GA, Hagen LS, Caton TM, Sanders DL (1986) Saccharin aversions in hamsters as a result of nicotine injections. *Pharmacol Biochem Behav* 24:567-570.
- Flores CM, Rogers SW, Pabreza LA, Wolfe BB, Kellar KJ (1992) A subtype of nicotinic cholinergic receptor in rat brain is composed of alpha 4 and beta 2 subunits and is up-regulated by chronic nicotine treatment. *Mol Pharmacol* 41:31-37.
- Furchgott RF, Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373-376.
- Fuxe K, Everitt BJ, Hokfelt T (1979) On the action of nicotine and cotinine on central 5-hydroxytryptamine neurons. *Pharmacol Biochem Behav* 10:671-677.
- Gaddnas H, Pietila K, Ahtee L (2000) Effects of chronic oral nicotine treatment and its withdrawal on locomotor activity and brain monoamines in mice. *Behav Brain Res* 113:65-72.
- Galzi JL, Changeux JP (1995) Neuronal nicotinic receptors: molecular organization and regulations. *Neuropharmacology* 34:563-582.
- Giasson BI, Ischiropoulos H, Lee VMYI, Trojanowski JQ (2002) The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in alzheimer's and parkinson's diseases. *Free Radic Biol Med* 32:1264-1275.

- Goldberg SR, Risner ME, Stolerman IP, Reavill C, Garcha HS (1989) Nicotine and some related compounds: effects on schedule-controlled behaviour and discriminative properties in rats. *Psychopharmacology* 97:295-302.
- 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.
- Gouazé V, Dousset N, Dousset JC, Valdiguié P (1998) Effects of nicotine and cotinine on the susceptibility to in vitro oxidation of LDL in healthy non smokers and smokers. *Clin Chim Acta* 277:25-37.
- Grady S, Marks MJ, Wonnacott S, Collins AC (1992) Characterization of nicotinic receptor-mediated [3H]dopamine release from synaptosomes prepared from mouse striatum. *J Neurochem* 59:848-856.
- Grady SR, Marks MJ, Collins AC (1994) Desensitization of nicotine-stimulated [3H]dopamine release from mouse striatal synaptosomes. *J Neurochem* 62:1390-1398.
- Hain NAK, Stuhmüller B, Hahn GR, Kalden JR, Deutzman R, Burmester GR (1996) Biochemical characterization and microsequencing of a 205-kDa synovial protein stimulatory for T cells and reactive with rheumatoid factor containing sera. *J Immunol* 157:1773-1780.
- Halladay AK, Schwartz M, Wagner GC, Iba MM, Sekowski A, Fisher H (1999) Efficacy of providing nicotine in a liquid diet to rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 221:215-223.
- Hariharan M, VanNoord T, Greden JF (1988) A high-performance liquid-chromatographic method for routine simultaneous determination of nicotine and cotinine in plasma. *Clin Chem* 34:724-729.
- Hatsukami D, Pentel PR, Jensen J, Nelson D, Allen SS, Goldman A, Rafael D (1998) Cotinine: effects with and without nicotine. *Psychopharmacology* 135:141-150.
- Hatsukami DK, Grillo MA, Pentel PR, Oncken C, Bliss R (1997) Safety of cotinine in humans: physiologic, subjective, and cognitive effects. *Pharmacol Biochem Behav* 57:643-650.
- Heinrichs SC, Cole BJ, Pich EM, Menzaghi F, Koob GF, Hauger RL (1992) Endogenous corticotropin-releasing factor modulates feeding induced by neuropeptide Y or a tail-pinch stressor. *Peptides* 13:879-884.
- Heinrichs SC, Pich EM, Miczek KA, Britton KT, Koob GF (1992) Corticotropin-releasing factor antagonist reduces emotionality in socially defeated rats via direct neurotropic action. *Brain Res* 581:190-197.
- Heishman SJ, Balfour DJ, Benowitz NL, Hatsukami DK, Lindstrom JM, Ockene JK (1997) Society for Research on Nicotine and Tobacco. *Addiction* 92:615-633.

- Henningfield JE, Goldberg SR (1983) Nicotine as a reinforcer in human subjects and laboratory animals. *Pharmacol Biochem Behav* 19:989-992.
- Herkenham M, Pert CB (1982) Light microscopic localization of brain opiate receptors: a general autoradiographic method which preserves tissue quality. *J Neurosci* 2:1129-1149.
- Hermes-lima M, Willmore WG, Storey KB (1995) Quantitation of lipid peroxydation in tissue extracts based on Re(III)xylene orange complex formation. *Free Radic Biol Med* 19:271-280.
- Herzig KE, Callaway E, Halliday R, Naylor H, Benowitz NL (1998) Effects of cotinine on information processing in nonsmokers. *Psychopharmacology (Berl)* 135:127-132.
- Holloway PW (1973) A simple procedure for removal of Triton X-100 from protein samples. *Anal Biochem* 53:304-308.
- Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS (1987) Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacological and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res* 61:866-879.
- Ikemoto S, Panksepp J (1999) The role of nucleus accumbens dopamine in motivated behavior: a unifying interpretation with special reference to reward-seeking. *Brain Res Brain Res Rev* 31:6-41.
- Indiana University Q.C.P.E. 395. In. Bloomington IN.
- Jang MH, Shin MC, Lim BV, Chung JH, Kang HS, Kang SA, Choue RW, Kim EH, Kim CJ (2002) Nicotine administration decreases nitric oxide synthase expression in the hypothalamus of food-deprived rats. *Neurosci Lett* 322:29-32.
- Jorenby DE, Hatsukami DK, Smith SS, Fiore MC, Allen S, Jensen J, Baker TB (1996) Characterization of tobacco withdrawal symptoms: transdermal nicotine reduces hunger and weight gain. *Psychopharmacology (Berl)* 128:130-138.
- Kalivas PW, Duffy P (1995) Selective activation of dopamine transmission in the shell of the nucleus accumbens by stress. *Brain Res* 675:325-328.
- Kalivas PW, Stewart J (1991) Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. *Brain Res Brain Res Rev* 16:223-244.
- Keenan RM, Hatsukami DK, Pentel PR, Thompson TN, Grillo MA (1994) Pharmacodynamic effects of cotinine in abstinent cigarette smokers. *Clin Pharmacol Ther* 55:581-590.
- Kelley AE, Smith-Roe SL, Holahan MR (1997) Response-reinforcement learning is dependent on N-methyl-D-aspartate receptor activation in the nucleus accumbens core. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:12174-12179.

- Kemenes I, Kemenes G, Andrew RJ, Benjamin PR, O'Shea M (2002) Critical time-window for NO-cGMP-dependent long-term memory formation after one-trial appetitive conditioning. *J Neurosci* 22:1414-1425.
- Kim KS, Borzelleca JF, Bowman ER, McKennis H, Jr. (1968) Effects of some nicotine metabolites and related compounds on isolated smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 161:59-69.
- Kita T, Nakashima T, Kurogochi Y (1985) Effects of oral administration of nicotine on circadian rhythms of ambulatory activity and drinking in rats. *Jpn J Pharmacol* 39:554-557.
- Koob GF (1992) Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends Pharmacol Sci* 13:177-184.
- Koob GF, Caine SB, Parsons L, Markou A, Weiss F (1997) Opponent process model and psychostimulant addiction. *Pharmacol Biochem Behav* 57:513-521.
- Koob GF, Le Moal M (1997) Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science* 278:52-58.
- Koob GF, Weiss F (1992) Neuropharmacology of cocaine and ethanol dependence. *Recent Dev Alcohol* 10:201-233.
- Kumar AR, Kurup PA (2002) Endogenous sodium-potassium ATPase inhibition related biochemical cascade in trisomy 21 and Huntington's disease: neural regulation of genomic function. *Neurol India* 50:174-180.
- Kuo BS, Dryjski M, Bjornsson TD (1989) Influence of nicotine and cotinine on the expression of plasminogen activator activity in bovine aortic endothelial cells. *Thromb Haemost* 61:70-76.
- Kurup RK, Kurup PA (2001) Hypothalamic digoxin, hemispheric dominance and the acquired immunodeficiency syndrome. *Neuroimmunomodulation* 9:286-294.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680.
- Lang WJ, Latiff AA, McQueen A, Singer G (1977) Self administration of nicotine with and without a food delivery schedule. *Pharmacol Biochem Behav* 7:65-70.
- Larsson C, Nilsson L, Halen A, Nordberg A (1986) Subchronic treatment of rats with nicotine: effects on tolerance and on [3H]acetylcholine and [3H]nicotine binding in the brain. *Drug Alcohol Depend* 17:37-45.
- Le Houezec J, Martin C, Cohen C, Molimard R (1989) Failure of behavioral dependence induction and oral nicotine bioavailability in rats. *Physiol Behav* 45:103-108.
- Leatherbarrow (1987) Enzfitter: a non-linearly regression data analysis program for the IBM PC (and true compatible). In. Amsterdam: Elsevier.
- Li NY, Li Y, Gorrod JW (1992) Determination of partition coefficient and ionization constants of (-)-nicotine and certain metabolites. *Med Sci Res* 20:901-902.

- Linert W, Bridge MH, Huber M, Bjugstad KB, Grossman S, Arendash GW (1999) In vitro and in vivo studies investigating possible antioxidant actions of nicotine: relevance to Parkinson's and Alzheimer's diseases. *Biochim Biophys Acta* 1454:143-152.
- Ljungberg T, Aplicella P, Schultz W (1992) Responses of monkey dopamine neurons during learning of behavioral reactions. *J Neurophysiol* 67:145-163.
- Lukic D, Haldar J (1993) Isotonic and hypertonic saline act as stressful stimuli for oxytocinergic system of the pituitary, hypothalamus and spinal cord. *Life Sci* 53:579-584.
- Machelska H, Pavone F, Capone F, Przewlocka B (1999) Antinociception after both peripheral and intrathecal injection of oxotremorine is modulated by spinal nitric oxide. *Eur Neuropsychopharmacol* 9:213-217.
- Majeed NH, Lason W, Przewlocka B, Przewlocki R (1986) Brain and peripheral opioid peptides after changes in ingestive behavior. *Neuroendocrinology* 42:267-272.
- Majid DS, Nishiyama A (2002) Nitric oxide blockade enhances renal responses to superoxide dismutase inhibition in dogs. *Hypertension* 39:293-297.
- Mansner R, Mattila MJ (1975) Nicotine induced tremor and antidiuresis and brain nicotine levels in the rat. *Med Biol* 53:169-176.
- Marks MJ, Burch JB, Collins AC (1983) Effects of chronic nicotine infusion on tolerance development and nicotinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 226:817-825.
- Marks MJ, Collins AC (1982) Characterization of nicotine binding in mouse brain and comparison with the binding of alpha-bungarotoxin and quinuclidinyl benzilate. *Mol Pharmacol* 22:554-564.
- Martin JL, Itzhak Y (2000) 7-Nitroindazole blocks nicotine-induced conditioned place preference but not LiCl-induced conditioned place aversion. *Neuroreport* 11:947-949.
- Marubio LM, Changeux J (2000) Nicotinic acetylcholine receptor knockout mice as animal models for studying receptor function. *Eur J Pharmacol* 393:113-121.
- Montgomery AM, Grottick AJ (1999) Neurotransmitter system interactions revealed by drug-induced changes in motivated behavior. *Pharmacol Biochem Behav* 62:643-657.
- Morgan MM, Ellison G (1987) Different effects of chronic nicotine treatment regimens on body weight and tolerance in the rat. *Psychopharmacology* 91:236-238.
- Mulle C, Vidal C, Benoit P, Changeux JP (1991) Existence of different subtype of nicotinic acetylcholine receptors in the habenulo-interpeduncular system. *J Neurosci* 11:2588-2597.
- Munson PJ, Rodbard D (1980) Ligand: a versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems. *Anal Biochem* 107:220-239.
- Murrin LC, Ferrer JR, Zeng WY, Haley NJ (1987) Nicotine administration to rats: methodological considerations. *Life Sci* 40:1699-1708.

- Naquira D, Arqueros L (1978) Water intake in rats affected by addition of nicotine to drinking water. *Acta Physiol Lat Am* 28:73-76.
- Nordberg A, Wahlstrom G, Arnelo U, Larsson C (1985) Effect of long-term nicotine treatment on [3H]nicotine binding sites in the rats brain. *Drug Alcohol Depend* 16:9-17.
- Ochoa EL (1994) Nicotine-related brain disorders: the neurobiological basis of nicotine dependence. *Cell Mol Neurobiol* 14:195-225.
- Oluyomi AO, Datla KP, Curzon G (1994) Effects of d-fenfluramine on feeding and hypothalamic 5-hydroxytryptamine and dopamine in male and female rats. *Eur J Pharmacol* 255:175-183.
- Orth SR, Viedt C, Ritz E (2001) Adverse effects of smoking in the renal patient. *Tohoku J Exp Med* 194:1-15.
- Ortiz PA, Garvin JL (2002) Role of nitric oxide in the regulation of nephron transport. *Am J Physiol Renal Physiol* 282:F777-784.
- Oxford Molecular L MAD V2.3. In. Oxford: The Magdalen Center.
- Pallone TL, Mattson DL (2002) Role of nitric oxide in regulation of the renal medulla in normal and hypertensive kidneys. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 11:93-98.
- Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S (1987) Nitric oxide accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327:524-526.
- Pavone F, Capone F, Populin R, Przewlocka B (1997) Nitric oxide synthase inhibitors enhance the antinociceptive effects of oxotremorine in mice. *Pol J Pharmacol* 49:31-36.
- Peng X, Gerzanich V, Anand R, Whiting PJ, Lindstrom J (1994) Nicotine-induced increase in neuronal nicotinic receptors results from a decrease in the rate of receptor turnover. *Mol Pharmacol* 46:523-530.
- Pianezza ML, Sellers EM, Tyndale RF (1998) Nicotine metabolism defect reduces smoking. *Nature* 393:750.
- Piazza PV, Le Moal ML (1996) Pathophysiological basis of vulnerability to drug abuse: role of an interaction between stress, glucocorticoids, and dopaminergic neurons. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36:359-378.
- Pietila K, Ahtee L (2000) Chronic nicotine administration in drinking water affects the striatal dopamine in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 66:95-103.
- Pietila K, Laakso I, Ahtee L (1995) Chronic oral nicotine administration affects the circadian rhythm of dopamine and 5-hydroxytryptamine metabolism in the striata of mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 353:110-115.

- Pietila K, Lahde T, Attila M, Ahtee L, Nordberg A (1998) Regulation of nicotinic receptors in the brain of mice withdrawn from chronic oral nicotine treatment. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 357:176-182.
- Pietila K, Salminen O, Leikola-Pelho T, Ahtee L (1996) Tolerance to nicotine's effects on striatal dopamine metabolism in nicotine-withdrawn mice. *Eur J Pharmacol* 318:17-22.
- Pogun S, Demirgoren S, Taskiran D, Kanit L, Yilmaz O, Koylu EO, Balkan B, London ED (2000) Nicotine modulates nitric oxide in rat brain. *Eur Neuropsychopharmacol* 10:463-472.
- Pokk P, Vali M (2002) The effects of the nitric oxide synthase inhibitors on the behaviour of small-platform-stressed mice in the plus-maze test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 26:241-247.
- Pomerleau CS, Ehrlich E, Tate JC, Marks JL, Flessland KA, Pomerleau OF (1993) The female weight-control smoker: a profile. *J Subst Abuse* 5:391-400.
- Pomerleau CS, Pomerleau OF, McPhee K, Morrell EM (1990) Discordance of physiological and biochemical response to smoking and to psychological stress. *Br J Addict* 85:1309-1316.
- Pomerleau OF, Pomerleau CS (1990a) Behavioural studies in humans: anxiety, stress and smoking. *Ciba Found Symp* 152:225-235.
- Pomerleau OF, Pomerleau CS (1990b) Cortisol response to a psychological stressor and/or nicotine. *Pharmacol Biochem Behav* 36:211-213.
- Pomerleau OF, Pomerleau CS, Marks JL (2000) Abstinence effects and reactivity to nicotine during 11 days of smoking deprivation. *Nicotine Tob Res* 2:149-157.
- Pradhan SN, Bowling C (1971) Effects of nicotine on self-stimulation in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 176:229-243.
- Przewlocka B, Mika J, Capone F, Machelska H, Pavone F (1999) Intrathecal oxotremorine affects formalin-induced behavior and spinal nitric oxide synthase immunoreactivity in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 62:531-536.
- Qiu BS, Cho CH, Hui SC, Ogle CW (1992) Chronic nicotine intake increases the responses to muscarinic receptor stimulation. *Pharmacology* 44:41-47.
- Rada P, Jensen K, Hoebel BG (2001) Effects of nicotine and mecamylamine-induced withdrawal on extracellular dopamine and acetylcholine in the rat nucleus accumbens. *Psychopharmacology (Berl)* 157:105-110.
- Rapier C, Lunt GG, Wonnacott S (1988) Stereoselective nicotine-induced release of dopamine from striatal synaptosomes: concentration dependence and repetitive stimulation. *J Neurochem* 50:1123-1130.



- Reavill C, Walther B, Stolerman IP, Testa B (1990) Behavioural and pharmacokinetic studies on nicotine, cytisine and lobeline. *Neuropharmacology* 29:619-624.
- Rebec GV, Christensen JR, Guerra C, Brado MT (1997) Regional and temporal differences in real-time dopamine efflux in the nucleus accumbens during free-choice novelty. *Brain Res* 776:61-67.
- Reddy DS, Kulkarni SK (1998) Inhibition of neuronal nitric oxide synthase (n-cNOS) reverses the corticotrophin-induced behavioral effects in rats. *Mol Cell Biochem* 183:25-38.
- Reid MS, Mickalian JD, Delucchi KL, Berger SP (1999) A nicotine antagonist, mecamylamine, reduces cue-induced cocaine craving in cocaine-dependent subjects. *Neuropsychopharmacology* 20:297-307.
- Riah O (1996) Mécanisme d'action de la cotinine : Interactions nicotiniques, étude pharmacocinétique et pharmacodynamique, identification et purification de son récepteur. Thèse Science des agroressources. Toulouse. Institut National Polytechniques.
- Riah O, Courriere P, Dousset JC, Belahsen Y (2000b) Cotinine is psychoactive through p40. In: IOe Neuropharmacology conference. Abstract. Maryland, USA.
- Riah O, Courriere P, Dousset JC, Todeschi N, Labat C (1998) Nicotine is more efficient than cotinine at passing the blood-brain barrier in rats. *Cell Mol Neurobiol* 18:311-318.
- Riah O, Dousset J, Courriere P (1997a) Metabolite de la nicotine, la cotinine deviendra-t-elle un jour un médicament? In: *Le quotidien du Medecin*, p 11.
- Riah O, Dousset J, Courriere P (1998a) Cotinine, from tobacco smoke to gene. *Bulletin de l'ARN*:30-35.
- Riah O, Dousset J, Dousset N (2002) Hydroperoxide cascade signaling upon cotinine administration to mice. In: *Role of free radicals, oxidants and antioxidants, in molecular and cell biology and life process. New developments and techniques* (International TXBMotSfFRR, ed). Paris.
- Riah O, Dousset JC, Bofill-Cardona E, Courriere P (2000) Isolation and microsequencing of a novel cotinine receptor. *Cell Mol Neurobiol* 20:653-664.
- Riah O, Dousset JC, Courriere P, Baziard-Mouysset G, Ecalle R (1997) Synthesis of cotinine and cotinine N-oxide : evaluation of their interaction with nicotine in the insecticidal activity. *Nat Prod Lett* 11:37-45.
- Riah O, Dousset JC, Courriere P, Stigliani JL, Baziard-Mouysset G, Belahsen Y (1999) Evidence that nicotine acetylcholine receptors are not the main targets of cotinine toxicity. *Toxicol Lett* 109:21-29.

- Riobo NA, Schopfer FJ, Boveris AD, Cadenas E, Poderoso JJ (2002) The reaction of nitric oxide with 6-hydroxydopamine: implications for Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med* 32:115-121.
- Risner ME, Cone EJ, Benowitz NL, Jacob P, 3rd (1988) Effects of the stereoisomers of nicotine and nornicotine on schedule-controlled responding and physiological parameters of dogs. *J Pharmacol Exp Ther* 244:807-813.
- Risner ME, Goldberg SR, Prada JA, Cone EJ (1985) Effects of nicotine, cocaine and some of their metabolites on schedule-controlled responding by beagle dogs and squirrel monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* 234:113-119.
- Robinson SF, Marks MJ, Collins AC (1996) Inbred mouse strains vary in oral self-selection of nicotine. *Psychopharmacology (Berl)* 124:332-339.
- Robinson TE, Berridge KC (1993) The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Brain Res Rev* 18:247-291.
- Rose JE, Behm FM, Westman EC (1998) Nicotine-mecamylamine treatment for smoking cessation: The role of pre-cessation therapy. *Exp Clin Psychopharmacol* 6:331-343.
- Rose JE, Behm FM, Westman EC (2001) Acute effects of nicotine and mecamylamine on tobacco withdrawal symptoms, cigarette reward and ad lib smoking. *Pharmacol Biochem Behav* 68:187-197.
- Rose JE, Behm FM, Westman EC, Levin ED, Stein RM, Ripka GV (1994) Mecamylamine combined with nicotine skin patch facilitates smoking cessation beyond nicotine patch treatment alone. *Clin Pharmacol Ther* 56:86-99.
- Rowell PP, Hillebrand JA (1994) Characterization of nicotine-induced desensitization of evoked dopamine release from rat striatal synaptosomes. *J Neurochem* 63:561-569.
- Rowell PP, Hurst HE, Marlowe C, Bennett BD (1983) Oral administration of nicotine: its uptake and distribution after chronic administration to mice. *J Pharmacol Methods* 9:249-261.
- Rowell PP, Li M (1997) Dose-response relationship for nicotine-induced up-regulation of rat brain nicotinic receptors. *J Neurochem* 68:1982-1989.
- Sacaan AI, Dunlop JL, Lloyd GK (1995) Pharmacologic characterization of neuronal acetylcholine gated ion channel receptor-mediated hippocampal norepinephrine and striatal dopamine release from rat brain slices. *J Pharmacol Exp Ther* 274:224-230.
- Sanderson EM, Drasdo AL, McCrea K, Wonnacott S (1993) Upregulation of nicotinic receptors following continuous infusion of nicotine is brain-region-specific. *Brain Res* 617:349-352.

- Sannerud CA, Prada J, Goldberg DM, Goldberg SR (1994) The effects of sertraline on nicotine self-administration and food-maintained responding in squirrel monkeys. *Eur J Pharmacol* 271:461-469.
- Schmitt U, Hiemke C (1998) Combination of open field and elevated plus-maze: a suitable test battery to assess strain as well as treatment differences in rat behavior. *Prog Neuro-Psychopharmacol & Biol psychiat* 22:1197-1215.
- Sershen H, Debler EA, Lajtha A (1987) Effect of ascorbic acid on the synaptosomal uptake of [3H]MPP+, [3H]dopamine, and [14C]GABA. *J Neurosci Res* 17:298-301.
- Shoaib M, Stolerman IP (1999) Plasma nicotine and cotinine levels following intravenous nicotine self-administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 143:318-321.
- Shoaib M, Stolerman IP, Kumar RC (1994) Nicotine-induced place preferences following prior nicotine exposure in rats. *Psychopharmacology* 113:445-452.
- Siegmund B, Leyden DE, Zikulnig E, Leitner E, Murkovic M, Pfannhauser W, Reif H (2001) The contribution of dietary nicotine and dietary cotinine to salivary cotinine levels as a nicotine biomarker. *Food chem* 74:259-265.
- Silver AA, Penny E, Shytle RD, Sanberg PR (2000) Clinical relevance of the nicotine receptor antagonist mecamylamine in treating neuropsychiatric disorders. *Today's therapeutic trends* 18:255-273.
- Smith TL, Russell GB, Mosberg AT (1994) Long-term systemic hemodynamic effects of cotinine in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 23:458-465.
- Snell LD, Johnson KM (1989) Effects of nicotinic agonists and antagonists on N-methyl-D-aspartate-induced 3H-norepinephrine release and 3H-(1-1-(2-thienyl)cyclohexyl-piperidine) binding in rat hippocampus. *Synapse* 3:129-135.
- Snyder SH, Brecht DS (1991) Nitric oxide as a neuronal messenger. *Trends Pharmacol Sci* 12:125-128.
- Sora I, Takahashi N, Funada M, Ujike H, Revay RS, Donovan DM, Miner LL, Uhl GR (1997) Opiate receptor knockout mice define mu receptor roles in endogenous nociceptive responses and morphine-induced analgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:1544-1549.
- Soto-Otero R, Mendez-Alvarez E, Hermida-Ameijeiras A, Lopez-Real AM, Labandeira-Garcia JL (2002) Effects of (-)-nicotine and (-)-cotinine on 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress and neurotoxicity: relevance for Parkinson's disease. *Biochem Pharmacol* 64:125-135.
- Sparks JA, Pauly JR (1999) Effects of continuous oral nicotine administration on brain nicotinic receptors and responsiveness to nicotine in C57Bl/6 mice. *Psychopharmacology (Berl)* 141:145-153.

- Stalhandske T (1970) The metabolism of nicotine and cotinine by a mouse liver preparation. *Acta Physiol Scand* 78:236-248.
- Steel GG, Peckham MJ (1979) Exploitable mechanisms in combined radiotherapy-chemotherapy: the concept of additivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 5:85-91.
- Stolerman IP (1993) Components of drug dependence: reinforcement, discrimination and adaptation. *Biochem Soc Symp* 59:1-12.
- Stolerman IP, Jarvis MJ (1995) The scientific case that nicotine is addictive. *Psychopharmacology* 117:2-10.
- Stolerman IP, Shoaib M (1991) The neurobiology of tobacco addiction. *Trends Pharmacol Sci* 12:467-473.
- Su Y, Han W, Giraldo C, De Li Y, Block ER (1998) Effect of cigarette smoke extract on nitric oxide synthase in pulmonary artery endothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19:819-825.
- Swillens S (1992) How to estimate the total receptor concentration when the specific radioactivity of the ligand is unknown. *Trends Pharmacol Sci* 13:430-434.
- Sziraki I, Sershen H, Benuck M, Lipovac M, Hashim A, Cooper TB, Allen D, Lajtha A (1999) The effect of cotinine on nicotine- and cocaine-induced dopamine release in the nucleus accumbens. *Neurochem Res* 24:1471-1478.
- Takada K, Swedberg MD, Goldberg SR, Katz JL (1989) Discriminative stimulus effects of intravenous l-nicotine and nicotine analogs or metabolites in squirrel monkeys. *Psychopharmacology* 99:208-212.
- Tayfun Uzbay I, Oglesby MW (2001) Nitric oxide and substance dependence. *Neurosci Biobehav Rev* 25:43-52.
- Uhl GR, Vandenberg DJ, Miner LL (1996) Knockout mice and dirty drugs. *Drug addiction. Curr Biol* 6:935-936.
- Vainio PJ, Tornquist K, Tuominen RK (2000) Cotinine and nicotine inhibit each other's calcium responses in bovine chromaffin cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 163:183-187.
- Vainio PJ, Viluksela M, Tuominen RK (1998) Inhibition of nicotinic responses by cotinine in bovine adrenal chromaffin cells. *Pharmacol Toxicol* 83:188-193.
- Van Gilder TJ, Remington PL, Fiore MC (1997) The direct effects of nicotine use on human health. *Wis Med J* 96:43-48.
- Vanhoutte PM (1989) Endothelium and the control of vascular function. *Hypertension* 13:658-667.
- Vidal C, Changeux JP (1993) Nicotinic and muscarinic modulations of excitatory synaptic transmission in the rat prefrontal cortex in vitro. *Neuroscience* 56:23-32.

- Wada E, McKinnon D, Heinemann S, Patrick J, Swanson LW (1990) The distribution of mRNA encoded by a new member of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor gene family (alpha 5) in the rat central nervous system. *Brain Res* 526:45-53.
- Wada E, Wada K, Boulter J, Deneris E, Heinemann S, Patrick J, Swanson LW (1989) Distribution of alpha 2, alpha 3, alpha 4, and beta 2 neuronal nicotinic receptor subunit mRNAs in the central nervous system: a hybridization histochemical study in the rat. *J Comp Neurol* 284:314-335.
- Wadley FM (1945) The evidence required to show synergistic action of insecticides and a short cut in analysis. In: , p 223. ET: US Department of agriculture.
- Wager-Srdar SA, Levine AS, Morley JE, Hoidal JR, Niewoehner DE (1984) Effects of cigarette smoke and nicotine on feeding and energy. *Physiol Behav* 32:389-395.
- Wang H, Carretero OA, Garvin JL (2002) Nitric oxide produced by THAL nitric oxide synthase inhibits TGF. *Hypertension* 39:662-666.
- Wassmann S, Laufs U, Stamenkovic D, Linz W, Stasch JP, Ahlbory K, Rosen R, Bohm M, Nickenig G (2002) Raloxifene improves endothelial dysfunction in hypertension by reduced oxidative stress and enhanced nitric oxide production. *Circulation* 105:2083-2091.
- Welch WJ, Wilcox CS (2002) What is brain nitric oxide synthase doing in the kidney? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 11:109-115.
- Weruaga E, Balkan B, Koylu EO, Pogun S, Alonso JR (2002) Effects of chronic nicotine administration on nitric oxide synthase expression and activity in rat brain. *J Neurosci Res* 67:689-697.
- Wetter DW, Smith SS, Kenford SL, Jorenby DE, Fiore MC, Hurt RD, Offord KP, Baker TB (1994) Smoking outcome expectancies: factor structure, predictive validity, and discriminant validity. *J Abnorm Psychol* 103:801-811.
- Whidby JF, Seeman JI (1976) The configuration of nicotine. A nuclear magnetic resonance study. *J Org Chem* 41:1585-1590.
- Whitehouse PJ, Martino AM, Marcus KA, Zweig RM, Singer HS, Price DL, Kellar KJ (1988) Reductions in acetylcholine and nicotine binding in several degenerative diseases. *Arch Neurol* 45:722-724.
- Whiting PJ, Lindstrom JM (1988) Characterization of bovine and human neuronal nicotinic acetylcholine receptors using monoclonal antibodies. *J Neurosci* 8:3395-3404.
- Winders SE, Grunberg NE, Benowitz NL, Alvares AP (1998) Effects of stress on circulating nicotine and cotinine levels and in vitro nicotine metabolism in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 137:383-390.
- Wise RA (1996) Neurobiology of addiction. *Curr Opin Neurobiol* 6:243-251.

- Wong D, Ogle CW (1995) The contrasting influence of chronic nicotine intake on gastrin and gastric acid secretion. *J Gastroenterol Hepatol* 10:577-584.
- Woolverton WL (1992) Determinants of cocaine self-administration by laboratory animals. *Ciba Found Symp* 166:149-161.
- Yamamoto I, Tomizawa M, Saito T, Miyamoto T, Walcott EC, Sumikawa K (1998) Structural factors contributing to insecticidal and selective actions of neonicotinoids. *Arch Insect Biochem Physiol* 37:24-32.
- Yamamoto I, Yabuta G, Tomizawa M, Saito T, Miyamoto T, Kagabu S (1995) Molecular mechanism for selective toxicity of nicotinoïds and neonicotinoïds. *Nippon Noyaku Gakkaishi* 20:33-40.
- Yamanaka K, Muramatsu I, Kigoshi S (1987) Effect of chronic nicotine treatment against repeated immobilization stress. *Pharmacol Biochem Behav* 26:259-263.
- Yamanaka K, Oshita M, Muramatsu I (1985) Alteration of alpha and muscarinic receptors in rat brain and heart following chronic nicotine treatment. *Brain Res* 348:241-248.
- Yamasu K, Shimada Y, Sakaizumi M, Soma G, Mizuno D (1992) Activation of the systemic production of tumor necrosis factor after exposure to acute stress. *Eur Cytokine Netw* 3:391-398.
- Yoshida M, Yokoo H, Mizoguchi K, Kawahara H, Tsuda A, Nishikawa T, Tanaka M (1992) Eating and drinking cause increased dopamine release in the nucleus accumbens and ventral tegmental area in the rat brain: measurement by in vivo microdialysis. *Neurosci Lett* 139:73-76.
- Young AMJ, Joseph MH, Gray JA (1992) Increased dopamine release in vivo in nucleus accumbens and caudate putamen of the rat during drinking: a microdialysis study. *Neuroscience* 48:871-876.

ANNEXE : PUBLICATIONS

ARTICLE 1 :           Synthesis of cotinine and cotinine N-oxide : evaluation of their interaction with nicotine in the insectidal activity

*Nat Prod Lett 1997*

<http://www.informaworld.com/smpp/content~content=a757956121~db=all~order=page>

ARTICLE 2 :           Evidence that nicotine acetylcholine receptor is not the main target of cotinine toxicity

*Toxicol Lett 1999*

<http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=1974763>

ARTICLE 3 :           Nicotine is moore efficient than cotinine at passing the blood-brain barrier in rats

*Cell Mol Neurobiol 1998*

<http://www.springerlink.com/content/w841854621608001/>

ARTICLE 4 :           Isolation and microsequencing of a novel cotinine receptor

*Cell Mol Neurobiol 2000*

<http://www.springerlink.com/content/k8134273068131p2/>