THESE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS
UFR des sciences fondamentales et appliquées
Laboratoire de neurosciences expérimentales et cliniques - LNEC
(Diplôme National - Arrêté du 7 août 2006)

École doctorale : Biologie-santé - Bio-santé
Secteur de recherche : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée par :
Joëlle Nader

Nouvelles stratégies pour prévenir les effets néfastes des psychostimulants : l'exposition à l'environnement enrichi et la stimulation du système cannabinoïde endogène

Directeur(s) de Thèse :
Marcello Solinas, Nathalie Thiriet

Soutenue le 16 novembre 2012 devant le jury

Jury :

Président	**Mohamed Jaber**	Professeur des Universités, Université de Poitiers
Rapporteur	**Catherine Belzung**	Professeur des Universités, Université de Tours
Rapporteur	**Catherine Le Moine**	Directeur de recherche, CNRS, Université Victor Segalen Bordeaux 2
Membre	**Marcello Solinas**	Chargé de recherche, CNRS, Université de Poitiers
Membre	**Nathalie Thiriet**	Maître de conférences, Université de Poitiers
Membre	**Emmanuel Valjent**	Chargé de recherche, INSERM de Montpellier

Pour citer cette thèse :
Joëlle Nader. *Nouvelles stratégies pour prévenir les effets néfastes des psychostimulants : l'exposition à l'environnement enrichi et la stimulation du système cannabinoïde endogène* [En ligne]. Thèse Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie. Poitiers : Université de Poitiers, 2012. Disponible sur Internet <http://theses.univ-poitiers.fr>

THESE

Pour l'obtention du Grade de
DOCTEUR DE l'UNIVERSITE DE POITIERS
(Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées)
(Diplôme National – Arrêté du 7 Août 2006)

Ecole Doctorale : BioSanté N°524
Secteur de Recherche : Aspects moléculaires et cellulaires de la Biologie

Présentée par

Joëlle NADER

Nouvelles stratégies pour prévenir les effets néfastes des psychostimulants : l'exposition à l'environnement enrichi et la stimulation du système cannabinoïde endogène

Directeurs de Thèse
Nathalie THIRIET et Marcello SOLINAS

Soutenue le 16 Novembre 2012
devant la Commission d'Examen :

Madame le Professeur Catherine BELZUNG	Rapporteur
Madame le Professeur Catherine LE MOINE	Rapporteur
Monsieur le Docteur Emmanuel VALJENT	Examinateur
Monsieur le Professeur Mohamed JABER	Examinateur
Madame le Docteur Nathalie THIRIET	Examinateur
Monsieur le Docteur Marcello SOLINAS	Examinateur

A mes parents …
Et A Dany …

REMERCIEMENTS

J'adresse mes remerciements, en premier lieu, aux membres du jury. Je remercie Madame le Professeur Catherine BELZUNG et Madame le Docteur Catherine LEMOINE d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse.

Merci également à Monsieur le Docteur Emmanuel VALJENT, pour m'avoir fait l'honneur de faire partie de mon jury.

*Je tiens à remercier Monsieur le Professeur **Mohamed Jaber** qui m'a accueillie dans son unité. Merci pour m'avoir permis de vivre cette expérience dans les meilleures conditions, humaines et scientifiques, et de m'avoir permis de faire partie de l'agréable famille du « LNEC ». Je ne pouvais rêver d'un milieu plus enrichissant pour faire mes premiers pas dans le monde de la recherche !*

*Je tiens à exprimer ma sincère gratitude à Madame le Docteur **Nathalie THIRIET**, ma directrice de thèse, qui a dirigé l'ensemble de ce travail. Je te suis très reconnaissante, pour avoir cru en mes capacités et pour la confiance que tu m'as accordée dès mon premier jour au labo. Merci pour ton encadrement et tes compétences scientifiques. Merci pour ton implication, ta générosité, ta disponibilité et ta patience. Merci pour tes conseils, toujours pertinents, et ton amitié. J'ai énormément appris à travers nos conversations scientifiques et variées. Ces années auront été très enrichissantes, aussi bien sur le plan scientifique que sur le plan humain.*

*Je remercie également Monsieur le Docteur **Marcello SOLINAS** qui a codirigé cette thèse. Merci pour la richesse de tes idées, ta rigueur scientifique, ton enthousiasme pour la Science et ta disponibilité. Merci de m'avoir donné la possibilité de participer à plusieurs congrès, nationaux et internationaux, et de découvrir le monde de la recherche.*

Un très grand merci à tous les membres du LNEC, chercheurs, enseignants chercheurs, techniciens et personnel administratif, qui m'ont très bien accueillie. Merci pour votre gentillesse, votre disponibilité et votre bonne humeur.

Virginie Lardeux et Maureen Francheteau, un grand merci pour votre aide technique et les agréables moments de paillasse que nous avons eus.

Merci également aux animalières qui se sont occupées de mes petites souris pendant ces trois ans.

*A toutes les « **filles** » du labo. Pour les citer : Sophie, Céline, Claire, Claudia, Marine, Maureen, Virginie, Laetitia et Nathalie V.. Merci pour les pauses déjeuners, les « restals », les goûters, et toutes les discussions et les fous rires que nous avons eus ensemble. Ces moments vont certainement me manquer.*

Merci Maureen pour toutes les heures de défoulement en danse africaine et au volley (aussi bien sur le terrain que dans les gradins !).

*Merci à tous mes **amis**, libanais et français, tourangeaux, parisiens et pictaviens, qui ont rendu inoubliables ces huit ans passés en France.*

*A **Pascale M.** « Marha », il y a un an, tu étais à ma place ! Tu m'as dit « à chacun son tour ». Aujourd'hui c'est à moi de te remercier pour toutes les sorties shopping, les cafés, les discussions, les pleurs, les délires, les chants, les conseils... Merci pour les inoubliables semaines passées à Rome, à Barcelone, et à Poitiers. Les aventures de « Farha w Marha » ne s'arrêteront pas là!!*

*A **Hania A.** Merci pour toutes ces journées et nuits passées à rédiger, à discuter, et à rigoler. J'ai fini !! Maintenant, c'est à ton tour de clôturer cette expérience et de publier ton travail … Tiens bon, tu y es presque !!*

*Un grand merci à ma deuxième famille, les SABEK. **Douha**, merci pour tous les conseils que tu m'as donnés, pour les WE remplis de conversations, de rires et de confidences. Merci de m'avoir donné la chance de faire partie de ta merveilleuse famille, et de m'avoir confié tes adorables enfants, Roxane, Phillipe et Louise.*

*Toute ma reconnaissance va à la famille **Chamieh**, parents et enfants. Merci pour tous les moments passés en famille. Une pensée particulière à **Michel C.**, pour tous les bons moments que nous avons passés ensemble, aussi*

bien à Tours qu'à Paris (Boulmich Café et Nazl el Sourour vont me manquer).

Un grand merci à ***Houssam H.*** *Les quelques phrases que je me permets de t'adresser ici ne sont pas suffisantes pour exprimer tout le respect, l'amitié et la reconnaissance que j'éprouve envers toi. Merci d'avoir été mon confident, de m'avoir supportée et soutenue, pendant toutes ces années. On a tous besoin d'une personne sur qui compter. Merci d'avoir été cette personne. Merci d'avoir répondu présent aux moments où j'en avais le plus besoin. Merci pour nos longs débats et nos chamailleries. Merci pour tes supers recettes et les supers restos que nous avons découvert ensemble, à Tours, à Poitiers, à Besançon, à Paris, à Langres, à Dijon, à Bordeaux…*

Enfin, à ma famille adorée, sans qui je ne serai pas là aujourd'hui.

Papa, *mon ange gardien, ta présence m'a manqué pendant ces années et me manquera toujours. Qu'est ce que je n'aurai donné pour t'avoir à mes côtés en ce grand jour. Merci de m'avoir appris à aimer la vie. J'espère que, depuis le paradis, tu es fier de ce que je suis devenue et de tout ce que j'ai accompli jusqu'à présent.*

Maman*, je t'adresse ici toute mon affection et ma plus profonde estime. Merci pour tout l'amour et la confiance que tu m'as témoigné, malgré les milliers de kilomètres qui nous séparent. Merci d'avoir été assez forte pour me soutenir et supporter mes sauts d'humeur. Merci pour ton « c'est pas grave !» qui m'a souvent aidé à franchir des obstacles de la vie.*

A ***Joseph****, mon grand frère sur qui j'ai pu compter pendant toutes ces années. Merci pour tes conseils, tes encouragements et ton soutien dans toutes les décisions que j'ai prises.*

A mes sœurs, ***Jessy*** *et* ***Joyce****. Pour tous nos souvenirs d'enfance que je garde au fond du cœur. Pour toutes les confidences auxquelles j'ai eu droit pendant les vacances d'été. Je suis désolée d'avoir choisi de grandir loin de vous. Mais je me rattraperai bientôt, c'est promis.*

A mon petit frère, ***Joudy****, que j'ai vu grandir par épisodes de quelques semaines. J'aurai voulu être présente plus souvent à tes côtés. J'espère que tu es fier de ce que ta grande sœur a pu accomplir, parce que moi, je suis très fière de l'homme que tu deviens.*

Ces remerciements signent la fin d'une aventure.

Huit ans en France, dont trois à Poitiers. Une expérience durant laquelle j'ai eu la chance de croiser un grand nombre de personnes enthousiastes, optimistes et sympathiques.

Huit ans de bonheur, de rencontres, et de découvertes, personnelles et professionnelles.

Huit ans qui ont fait de moi la personne que je suis aujourd'hui.

Huit ans au bout desquels j'ai rencontré mon âme sœur, l'homme avec qui j'écrirai la nouvelle histoire de ma vie, mon ***Dany*** *!!*

« Toute histoire a une fin. Mais dans la vie, chaque fin annonce une nouvelle histoire ... »

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS....3
RESUME....11
SUMMARY....12
Liste des travaux....13
Liste des illustrations....14
Liste des abréviations....16
Structure générale du manuscrit....18
Revue de la littérature....19
Chapitre 1 - Les psychostimulants....20
A- Généralités....20
1. La Cocaïne....20
2. La Méthamphétamine....22
B-Effets psychologiques et somatiques des psychostimulants....24
1.Effets psychologiques....24
i.Administration aigue....24
ii.Administration chronique....24
2.Effets somatiques....24
C- Effets neurobiologiques....25
1.Cibles moléculaires....25
i.Mode d'action de la cocaïne....25
ii.Mode d'action de la METH....26
2.Circuits neuronaux impliqués dans les effets récompensants des psychostimulants....27
i.Description du système dopaminergique mésocorticolimbique....28
ii.Description du circuit de l'amygdale étendue....29
iii.Interactions des psychostimulants avec le circuit de la récompense....30
3.Interactions des psychostimulants avec les systèmes neuronaux impliqués dans la réponse au stress....31
i.L'axe HPA : principal système physiologique de réponse au stress....31
ii.Le système du CRF : un neuropeptide impliqué dans la réponse au stress....34
D- Dépendance aux psychostimulants....35
1.Description de la dépendance....35
i.Diagnostic....35
ii.Vulnérabilité....36
2. Mécanismes impliqués dans la dépendance....38
i.Les récepteurs dopaminergiques....40
ii.Les kinases....40
iii.Les facteurs de transcription : exemple de CREB....43
iv.Les gènes à réponse précoce....46
E-Toxicité induite par la METH....47
1.Atteintes neurologiques induites par la METH....47
i.Atteintes neurologiques chez l'Homme....48
ii.Atteintes neurologiques chez les primates non humains....49
iii.Atteintes neurologiques chez les rongeurs....50
2.Mécanismes de toxicité induits par la METH....50
i.METH et stress oxydatif....51
ii.METH et Hyperthermie....57
iii.Autre mécanisme impliqué dans la neurotoxicité : Activation gliale....58

Chapitre 2 – Impact des facteurs environnementaux sur les effets des drogues 61
A-Impact environnemental sur la dépendance aux drogues d'abus 62
3.Exposition à divers stress et consommation de drogues 62
i.Le stress 62
ii.Interactions neurobiologiques entre facteurs de stress et addiction 66
4.Impact des expériences positives sur la dépendance et modèle de l'environnement enrichi 68
i.L'environnement enrichi 68
ii.Impact de l'EE dans divers modèles de dépendance aux drogues 71
F-Impact environnemental sur les processus neurotoxiques 74
1.Impact des facteurs de stress sur les processus neurotoxiques 74
i.Effets toxiques du stress dans les régions corticolimbiques 74
ii.Impact du Stress sur les processus neurotoxiques 75
2.Impact de l'Environnement Enrichi sur les processus neurotoxiques 77
i.Impact de l'EE sur les maladies neurodégénératives 77
ii.Impact de l'EE sur les processus neurotoxiques induits par les psychostimulants 78
Chapitre 3 – Le Système Cannabinoïde Endogène 79
A-Généralités 80
G-Les composants du système cannabinoïde endogène 80
1.Les Récepteurs Cannabinoïdes 80
i.Le récepteur CB1 80
ii.Le récepteur CB2 81
iii.Signalisation des récepteurs CB1 et CB2 82
iv.Autres récepteurs fixant les cannabinoïdes 83
2.Les Endocannabinoïdes 84
i.L'Anandamide 85
ii.Le 2-arachidonoylglycérol 86
iii.Autres ECs 88
iv.Les ECs sont synthétisés à la demande 89
v.Les ECs : des messagers rétrogrades 89
vi.La métabolisation des ECs 90
H-SCE et système de récompense 92
1.Interaction du SCE avec le système de récompense 92
i.Implication des récepteurs CB1 92
ii.Implication des récepteurs CB2 94
iii.Effets des ECs sur le système de récompense 95
2.Effets des drogues d'abus sur le SCE 96
I-SCE et systèmes de stress 97
1.Régulation des émotions par le SCE 97
i.Les récepteurs cannabinoïdes 97
ii.Les ECs 98
2. Régulation du SCE par le stress 99
J-Rôle neuroprotecteur du SCE 99
1.SCE et atteintes cérébrales 100
2.Mécanismes potentiellement impliqués dans la neuroprotection induite par le SCE 101
i.SCE et modulation des neurotransmissions 101
ii.SCE et modulation du système immunitaire 103
iii.Effets opposés sur la survie/mort neuronale 104
Objectifs de la thèse 105

Résultats Expérimentaux 106
Discussion 161
A-Manipulation environnementale et dépendance 162
3.L'exposition à un EE protège contre l'addiction aux drogues d'abus 162
4.La modulation du niveau de stress : un mécanisme sous-tendant l'impact des manipulations environnementales sur la dépendance aux drogues ? 163
i.L'exposition à un EE diminue le niveau d'anxiété 164
ii.Le « switch » environnemental induit un état émotionnel négatif 164
iii.Mécanismes régulés par les manipulations environnementales et potentiellement impliqués dans la modulation du niveau de stress des individus 165
5.Perspectives 169
i.Etude de l'implication de la neurotransmission dopaminergique dans les effets préventifs de l'EE sur la sensibilisation à la cocaïne 169
ii.Existe-t-il une ségrégation neuronale de la phosphorylation de CREB induite par le « switch » EE>SE ? 172
K-Stratégies pour prévenir la neurotoxicité de la METH 173
1.Rappel : L'exposition à l'EE ne réduit pas la toxicité de la METH 174
2.La stimulation pharmacologique du SCE : une nouvelle approche pour prévenir la toxicité induite par la METH 174
3.Perspectives : caractériser les mécanismes sous tendant la neuroprotection induite par le SCE 176
i.Quel récepteur est impliqué dans la protection induite par le JZL184 ? 176
ii.Régulation de l'activité microgliale 176
Conclusion 178
Références Bibliographiques 180

RESUME

L'étude de l'impact des **facteurs environnementaux** sur les effets à long-terme des psychostimulants a montré que des facteurs négatifs, comme le stress, augmentent le risque de développer une addiction, alors que des facteurs positifs, comme l'exposition à des conditions stimulantes, le réduisent. Une partie de cette thèse a consisté à rechercher les **mécanismes neurobiologiques et cellulaires** qui sous tendent cette influence environnementale. Ainsi, l'exposition d'animaux à un environnement enrichi (EE), qui procure des conditions stimulantes, diminue leur **niveau d'anxiété**, un effet qui serait en partie lié à la régulation de gènes appartenant au **système cannabinoïde endogène** (SCE) dans des régions impliquées dans la réactivité au stress (Article 1). Par ailleurs, nos travaux ont mis en évidence des limites de l'exposition à l'EE : quand celle-ci est interrompue, ses effets bénéfiques sont perdus et la vulnérabilité à la cocaïne est même augmentée. Ceci s'expliquerait par l'apparition d'un état émotionnel négatif, associé à **une activation du facteur CREB** dans l'amygdale étendue, une région carrefour entre la récompense et le stress (Article 2). Nous nous sommes également intéressés à la **toxicité de la méthamphétamine** (METH) et à sa modulation par le SCE, pour lequel des propriétés neuroprotectives avaient déjà été suggérées. Ainsi, une stimulation pharmacologique du SCE permet de prévenir la neurotoxicité dopaminergique induite par la METH (Article 3). Nos résultats soulignent la complexité d'utilisation des manipulations environnementales et mettent en lumière les capacités protectrices du SCE contre la dépendance et la neurotoxicité engendrées par les psychostimulants.

Mots clés : addiction ; psychostimulants ; environnement enrichi ; stress ; système cannabinoïde endogène ; neurotoxicité

SUMMARY

Studies of the impact of environmental factors on the long-term effects of psychostimulants have shown that negative factors, such as stress, increase the risk of developing drug addiction, while positive factors, such as exposure to stimulating conditions, reduce it. The first aim of this work was to look for the **neurobiological and cellular mechanisms** that underlie this environmental influence. We found that exposure of animals to stimulating enriched environments (EE) reduces **anxiety** levels, an effect that may be partly related to the regulation of genes belonging to the **endogenous cannabinoid system** (ECS) in regions involved in stress reactivity (Article 1). In addition, our work has highlighted some limitations of the exposure to EE since discontinuation of enrichment results not only in the loss of its beneficial effects but also in increased vulnerability to cocaine. This effect is associated with emotional distress and changes in the activity of the **transcription factor CREB** in the extended amygdala, an interface region between reward and stress processes (Article 2). We also investigated whether ECS, for which neuroprotective properties have already been suggested, could reduce the brain **toxicity induced by methamphetamine** (METH). We found that pharmacological stimulation of ECS provides protection against the METH-induced dopaminergic neurotoxicity (Article 3). Our results highlight the complex consequences of environmental conditions on brain and behavior, and highlight the protective role of ECS against both addiction and neurotoxicity induced by psychostimulants.

Keywords: addiction; psychostimulants; enriched environment; stress; endogenous cannabinoid system; neurotoxicity.

Liste des travaux

Publications

Nader J, Chauvet C, El Rawas R, Favot L, Jaber M, Thiriet N, Solinas M. Loss of environmental enrichment increases vulnerability to cocaine addcition. Neuropsychopharmacology. **Neuropsychopharmacology** (2012) 37:1579-87

El Rawas R, Thiriet N, **Nader J**, Lardeux V, Jaber M, Solinas M. Early exposure to environmental enrichment alters the expression of genes of the endocannabinoid system. **Brain Research** (2011) 1390:80-9

Nader J, Rapino C, Gennequin B, François A, Francheteau M, Makryannis A, Macarrone M, Solinas M, Thiriet N. Stimulation of the Endocannabinoid System prevents Methamphetamine-induced neurotoxicity in mice *(en cours de préparation)*

Communications *(L'auteur souligné est celui qui a présenté le travail)*

Thiriet N, El Rawas R, Chauvet C, **Nader J**, Jaber M, Solinas M. Switch from enriched to standard living environment increases the rewarding effects of cocaine. 7th FENS meeting, Amsterdam – Pays Bas, Juillet 2010.

Nader J, Thiriet N, El Rawas R, Chauvet C, Jaber M, Solinas M. Switch from enriched to standard living environment increases the rewarding effects of cocaine. EBPS Workshop "Drug, Psychiatric Disorders and Neurogenesis", Tours – France, Septembre 2010.

Nader J, Chauvet C, El Rawas R, Favot L, Jaber M, Thiriet N, Solinas M. Switch from positive to neutral living environments increases vulnerability to cocaine. 10th Colloque de la Société des Neurosciences, Marseille – France, Mai 2011.

Thiriet N, **Nader J,** El Rawas R, Chauvet C, Jaber M, Solinas M. Switch from enriched to standard living environment increases the rewarding effects of cocaine. 8th IBRO world congress, Florence – Italie, Juillet 2011.

Nader J, Gennequin B, François A, Francheteau M, Solinas M, Thiriet N. Stimulation of the Endocannabinoid System prevents Methamphetamine-induced neurotoxicity in mice. 8th FENS meeting, Barcelone – Espagne, Juillet 2012.

Liste des illustrations

Figure 1. Structure du chlorhydrate de cocaïne. 21

Figure 2. Usage au cours de la vie de substances psychoactives (hors alcool, tabac et cannabis) parmi les 18-44 ans. Evolution en France, entre 1992 et 2010. Amphé : amphétamines ; XTC : extasy. Source : Baromètre Santé 1992, 1995, 2000, 2005, 2010, INPES exploitation OFDT www.ofdt.fr 22

Figure 3.Structure de la méthamphétamine. 23

Figure 4. Schéma représentatif des circuits neuronaux impliqués dans les effets renforçants des psychostimulants chez les rongeurs. 27

Figure 5. Schéma simplifié de la voie mésocorticolimbique chez les rongeurs. 29

Figure 6. L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (axe HPA) chez l'Homme. 33

Figure 7. L'interaction entre les facteurs génétiques, environnementaux et associés à la drogue permet d'évaluer la vulnérabilité au développement de l'addiction. 38

Figure 8. Boucle striato-thalamocorticale impliquée dans la régulation du système glutamatergique. 39

Figure 9. Mécanismes moléculaires intervenants dans les neuroadaptations induites par les drogues d'abus. 42

Figure 10. Représentation de la régulation de la stimulation de ERK par les kinases et les phosphatases suite à une administration aigue de psychostimulants. PP1 : protéine phosphatase 1 ; STEP : striatal enriched phosphatase (d'après Valjent et al., 2005) 43

Figure 11. Rétrocontrôle de l'activité des neurones dopaminergiques par la dynorphine. 45

Figure 12. Régulation des protéines de la famille FOS par les drogues d'abus. 47

Figure 13. Mécanismes d'interaction dopamine-glutamate impliqués dans la dégénérescence du système dopaminergique nigrostriatale. (Cadet et Brannock 1998) 52

Figure 14. Schéma représentatif des causes et conséquences de la neurotoxicité induite par la METH. 54

Figure 15. L'activation microgliale induite par la METH. 61

Figure 16. Représentation schématique de l'interaction neurobiologique entre stress et prise de drogues. 67

Figure 17. Illustrations de l'environnement enrichi 69

Figure 18. Interactions entre METH et stress. 77

Figure 19. Principales voies de signalisation des récepteurs cannabinoïdes. 84

Figure 20. Mécanisme de synthèse de l'anandamide. (d'après la revue (Cadas et al, 1997)) 86

Figure 21. Deux principales voies de synthèse du 2-AG ont été identifiées (Piomelli, 2003) 87

Figure 22. Mécanismes impliqués dans la synthèse du 2-AG via la PLC. (d'après Doherty et Dingledine, 2003) 87

Figure 23.Structure chimique de la Virodhamine et la Noladine. (Piomelli, 2003) 88

Figure 24. Les ECs sont des messagers rétrogrades. (Venance et al, 2004).....90

Figure 25. Localisation des mécanismes de synthèse et de dégradation des ECs. (d'après (Di Marzo et al., 2004)) 92

Figure 26. Régulation de l'activité des canaux ioniques présynaptiques par activation des récepteurs CB1. (Piomelli, 2003).....102

Figure 27.Schéma représentant le rétrocontrôle négatif exercé par les endocannabinoïdes (eCB) sur les neurones CRF du PVN. Suite à l'activation de l'axe HPA, la corticostérone (CORT) libérée par les glandes surrénales induit, par activation des récepteurs aux glucocorticoïdes (mGR) (1), la synthèse (2) et la libération (3) d'eCB par les neurones CRF. Ces eCB activent les récepteurs CB1 exprimés par les neurones présynaptiques glutamatergiques (4), inhibent la libération de glutamate (5), diminuant ainsi la libération de CRF par les neurones du PVN (6). (d'après (Hill et al, 2010)).....167

Figure 28.Schéma représentant les mécanismes potentiellement impliqués dans la mise en place des conséquences négatives induites par la perte des conditions stimulantes. 169

Figure 29. Schéma représentatif des voies de signalisation intracellulaires activées en réponse aux drogues d'abus. (d'après (Lu et al, 2006)).....171

Liste des abréviations

METH : méthamphétamine

AMPH : amphétamine

DA : dopamine

CPF : cortex préfrontal

CPu : noyau caudé putamen

NAc : noyau accumbens

ATV : aire tegmentale ventrale

BLA : amygdale basolatérale (basolateral amygdala)

DAT : transporteur dopaminergique (dopamine transporter)

VMAT : transporteur vésiculaire de monoamine (vesicular monoamine transporter)

GABA : acide gamma-aminobutyrique (gamma aminobutyric acid)

BNST : noyau du lit de la strie terminale (bed nucleus of the stria terminalis)

CeA : amygdale centrale (central amygdala)

Axe HPA : axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (hypothalamic-pituitary-adrenal axis)

CRF : corticotropin releasing factor

6-OHDA : 6-hydroxydopamine

PVN : noyau paraventriculaire (paraventricular nucleus)

ACTH : hormone corticotrope (adrenocorticotropic hormone)

SN : substance noire

AMPA : récepteur α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate

NMDA : récepteur N-methyl-D-aspartate

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

CREB : protéine se fixant au site CRE (cAMP response element binding protein)

PKA : protéine kinase A

DARPP32 : phosphoprotéine régulée par la dopamine et l'AMPc (dopamine and AMPc responsive phosphoprotein 32)

ERK : extracellular signal-regulated kinase

MAP kinase : protéine kinase activée par des agents mitogènes (mitogen activated protein kinase)

MEK : MAPK/ERK kinase

SNC : système nerveux central

TH : tyrosine hydroxylase

CPP : préférence de place conditionnée (Conditioned Place Preference)

BDNF : facteur neurotrophique dérivé du cerveau (brain derived neurotrophic factor)

ROS : espèce réactive oxygénée (reactive oxygen species)

CuZnSOD : cuivre/zinc superoxyde dismutase

NO : monoxyde d'azote (nitric oxyde)

NOS : NO synthase

ATP : adenosine triphosphate

THC: delta-9-hydrocannabinol

SCE : système cannabinoïde endogène

EC : endocannabinoïde ou cannabinoïde endogène

JNK : c-Jun-N-terminal kinase

2-AG : 2-arachidonylglycérol

PLD : phospholipase D

PLA1 : phospholipase A-1

PLC : phospholipase C

FAAH : fatty acid amide hydrolase

MGL : monoacylglycerol lipase

EE : environnement enrichi

SE : environnement standard

MPTP : 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine

SOD : superoxyde dismutase

Structure générale du manuscrit

Ce travail de thèse a consisté à rechercher des outils de protection contre les effets addictifs et toxiques des psychostimulants. Dans la première partie de ce manuscrit, une analyse bibliographique décrit le contexte scientifique de ces travaux de thèse. Cette partie est divisée en trois chapitres. Dans le premier, je présenterai les deux psychostimulants utilisés lors de mes travaux de thèse, la cocaïne et la méthamphétamine. J'expliquerai leurs mécanismes d'action et je décrirai, plus spécifiquement, des mécanismes sous-tendant la neurotoxicité induite par la méthamphétamine qui, en comparaison avec les autres psychostimulants, a la particularité d'induire une forte toxicité neuronale. Le deuxième chapitre traitera des facteurs environnementaux supposés avoir un impact sur les effets à long terme induits par les psychostimulants, comme le démontrent les résultats récemment obtenus dans notre équipe. Enfin, le troisième chapitre sera consacré à la présentation du système cannabinoïde endogène que nous avons ciblé, en vue de réduire la toxicité de la méthamphétamine. Dans la deuxième partie du manuscrit seront présentés les principaux résultats obtenus et qui ont fait l'objet de deux articles scientifiques publiés et d'un troisième, en cours de préparation. Une discussion générale des résultats obtenus et les perspectives envisagées sont présentées à la fin de ce document.

Revue de la littérature

Chapitre 1 - Les psychostimulants

Dans ce chapitre, je présenterai (1) les deux psychostimulants, la cocaïne et la méthamphétamine (METH), utilisés pendant ma thèse ; (2) les adaptations cellulaires et moléculaires induites par ces deux psychostimulants, ainsi que (3) les mécanismes de neurotoxicité induits dans le cadre de la consommation de METH.

A- Généralités

1. La Cocaïne

La cocaïne est un alcaloïde extrait à partir des feuilles de deux cocaïers : *Erythroxylum coca* et *Erythroxylum novogranatense.* Ces arbustes poussent à l'état sauvage en Amérique du Sud, dans la cordillère des Andes. L'usage de cette plante remonte à plus de 5000 ans, où les peuples Amérindiens la considéraient comme plante sacrée et l'utilisaient lors de cérémonies religieuses. Pendant longtemps, la coca fut utilisée, sous forme de tisane ou de pâte masticatoire, pour bloquer la faim et la fatigue, et pour se protéger contre le froid en altitude. Les premières feuilles de coca n'arrivèrent en Europe qu'en 1750, grâce au botaniste français Joseph de Jussieu, mais l'intérêt scientifique pour cette plante ne débuta qu'au XIX^{ème} siècle avec l'extraction de la cocaïne et la détermination de sa formule chimique $C_{17}H_{21}NO_4$ (Figure 1). Elle fut notamment utilisée comme anesthésique locale lors des chirurgies, comme substitut pour traiter les addictions à l'alcool, à l'opium et à la morphine, et dans le traitement des maladies respiratoires et des troubles gastriques. Vers la fin du XIX^{ème} siècle la cocaïne fut incorporée dans différentes boissons telles que le Coca-Cola. A la même époque se répandit un nouveau procédé de consommation, plus simple et beaucoup plus efficace : l'inhalation de la poudre de cocaïne. Et au début du XX^{ème} siècle, plusieurs cas de dépendance furent décrits. Commença alors la lutte contre la consommation de la cocaïne. L'adoption du « Harrison Narcotic Act » aux Etats-Unis en 1914 a permis de réglementer l'usage et la distribution de la cocaïne et à interdire, progressivement, son usage non-médical. En 1916, la France publia une liste de stupéfiants et une loi interdisant la consommation des drogues. En 1961, l'ONU signa la « convention unique sur les

stupéfiants » visant à limiter la production et le commerce de ces substances. Dans les années 70-80, une nouvelle épidémie de consommation de cocaïne s'installa, avec l'apparition d'une forme de cocaïne insoluble dans l'eau, le « crack », moins chère et plus efficace que la cocaïne en poudre. Depuis, le trafic, la consommation et les décès liés à la cocaïne ne cessent d'augmenter (OEDT, 2006).

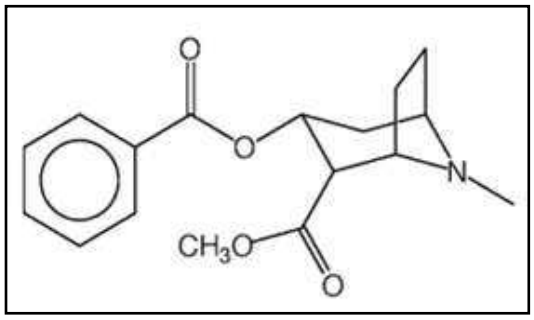


Figure 1. Structure du chlorhydrate de cocaïne.

La cocaïne est la deuxième drogue la plus consommée dans le monde, après le cannabis et une hausse globale de sa consommation a été observée au sein de l'Union Européenne lors de la dernière décennie (OEDT, 2006) (Figure 2). Cette augmentation est notamment associée à la baisse de son prix, la hausse de sa disponibilité sur le marché, la baisse de l'âge de première prise et la diversification des modes de consommation (OEDT, 2006). Sous forme de poudre, elle peut être inhalée directement ou chauffée afin d'inhaler ses vapeurs. L'effet se fait sentir au bout de 2 minutes et dure environ 1 heure. Elle peut être aussi fumée, ingérée ou injectée en intraveineuse. Ce dernier mode d'administration permet de sentir rapidement les effets de la drogue (environ 10 secondes).

En fonction du mode d'administration, de la dose consommée et du sujet lui-même, la demi-vie de la cocaïne peut s'élever jusqu'à 90 minutes. Une grande partie de la drogue est métabolisée dans le foie dans les 2 heures qui suivent sa prise, et ceci selon 3 voies de dégradation (Fleming et al., 1990) :

(1) Celle des estérases hépatiques produisant l'ester de méthylecgonine ;

(2) L'hydrolyse spontanée, sans intervention enzymatique, produisant la benzylecgonine ;

(3) La N-déméthylation de la cocaïne produisant un produit actif, la norcocaïne.

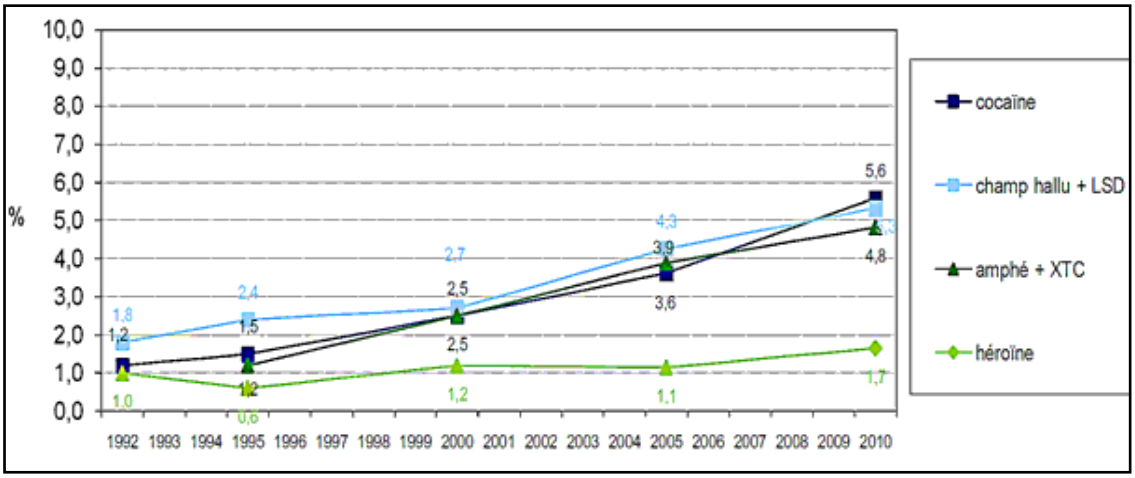


Figure 2. Usage au cours de la vie de substances psychoactives (hors alcool, tabac et cannabis) parmi les 18-44 ans. Evolution en France, entre 1992 et 2010. Amphé : amphétamines ; XTC : extasy. *Source : Baromètre Santé 1992, 1995, 2000, 2005, 2010, INPES exploitation OFDT www.ofdt.fr*

Selon la voie d'administration utilisée, l'élimination des métabolites de la cocaïne se fait en proportions variables (Ambre et al., 1988). Ils peuvent être détectés dans l'urine jusqu'à 4h après la prise de cocaïne, dans le lait maternel jusqu'à 36h après la prise de la drogue, ainsi que dans les cheveux et les ongles après de longues périodes, puisqu'ils gardent une trace des produits consommés au moment où ils poussent.

2. La Méthamphétamine

La METH est un psychostimulant appartenant à la famille des phénéthylamines substitués. Sa structure est apparentée à l'amphétamine (AMPH) et, ensemble, font partie d'un groupe de composés couramment désigné comme amphétamines (Fleckenstein et al., 2007) (Figure 3).

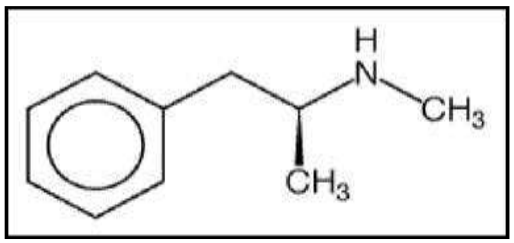


Figure 3.Structure de la méthamphétamine.

Largement distribuée pendant la deuxième guerre mondiale, la METH fut prescrite aux Etats-Unis contre diverses maladies, comme la dépression et l'obésité, avant d'être classée comme stupéfiant en 1970 (pour revue (Chiadmi and Schlatter, 2009)). Au début des années 2000, cette drogue traverse l'Atlantique pour apparaître dans le marché des drogues britanniques (Schifano et al., 2007), puis en France. La majeure partie de la production européenne est localisée en Europe de l'Est, notamment en République Tchèque, en Slovaquie et en Bulgarie (Chiadmi and Schlatter, 2009). Connues sous diverses appellations (crank, speed, pilule thaï, crystal, ice, crystal meth…), la consommation de la METH a rapidement augmenté au cours de la dernière décennie puisque, sur le marché illicite, la METH, avec une pureté moyenne de 43 à 50%, fait partie des drogues les moins chères : un gramme de METH coûte en moyenne 17€ contre 60€ pour le gramme de cocaïne (OEDT, 2006).

La synthèse de la METH est facile et peut être réalisée à partir de produits chimiques et de médicaments relativement courants mais de plus en plus contrôlés. Les principaux précurseurs sont des médicaments délivrés en pharmacie sans ordonnance comme décongestionnants nasaux : la pseudoéphédrine, l'éphédrine et la noréphédrine ou phénylpropanolamine (Barr et al., 2006). La synthèse de la METH nécessite aussi des produits chimiques secondaires tels que le phosphore rouge, l'iode, le lithium, l'ammoniac anhydre, le toluène et autres solvants bases et acides. L'accès facile à ces produits a permis le développement de nombreux laboratoires artisanaux de production de METH (Barr et al., 2006).

La METH se présente essentiellement sous forme de poudre blanche et cristalline, inodore, pouvant être dissoute facilement dans l'eau ou l'alcool. Elle peut être fumée,

aspirée par voie nasale ou injectée par voie intraveineuse. Elle peut même être compressée sous forme de comprimés et ingérée. Sa dégradation a lieu dans le foie et produit différents métabolites, dont l'AMPH et le 4-hydroxyméthamphétamine, tous les deux éliminés par voie rénale (Caldwell et al., 1972).

B- Effets psychologiques et somatiques des psychostimulants

1. Effets psychologiques

i. Administration aigue

L'administration aigue de cocaïne est généralement accompagnée d'un sentiment de puissance et de maîtrise de soi. Le sujet se sent confiant, très énergique et euphorique. Cette phase est appelée « rush » ou « flash » et est de type orgasmique. L'effet de la drogue dure quelques heures et son intensité varie en fonction de la dose administrée, du mode de consommation ainsi que de la fréquence de la prise. Une fois les premiers effets disparus, le sujet se retrouve face à une fatigue intense et l'euphorie est remplacée par une dépression. C'est la phase dite de « crash ».

ii. Administration chronique

L'effet plaisant ressenti lors des premières prises de drogue pousse certains individus à en reprendre, de façon contrôlée au départ puis de manière excessive et compulsive. On parle alors de dépendance aux drogues. Cette consommation excessive induit des dommages physiologiques et psychoaffectifs, aussi bien pour le sujet que pour son environnement. La consommation chronique de psychostimulants est notamment associée à des troubles de la mémoire, de l'humeur ainsi qu'à des hallucinations et des délires de type paranoïde (Koob et le Moal, 2006).

2. Effets somatiques

Chez l'Homme, quelque soit la voie d'administration, les psychostimulants induisent plusieurs manifestations somatiques. Ils stimulent le système nerveux sympathique provoquant une hausse du rythme cardiaque et respiratoire, une augmentation de la pression sanguine, une augmentation de la température et une dilatation des pupilles (pour revue : METH (Chiadmi and Schlatter, 2009) ; Cocaïne (Johanson and Fischman, 1989)). La cocaïne est connue pour son activité anesthésique locale puisqu'elle est capable d'inhiber les canaux sodiques dépendants du voltage, de façon rapide et réversible. Elle produit ainsi une insensibilisation temporaire des terminaisons nerveuses. A plus long terme, la METH peut provoquer la mort en induisant des hémorragies cérébrales, des infarctus du myocarde, des ruptures hépatiques et rénales ainsi qu'une forte hyperthermie (pour revue (Albertson et al., 1999)). Enfin, La METH et la cocaïne sont aussi des substances anorexigènes et provoquent des troubles du sommeil, ainsi que des sudations et des douleurs musculaires.

C- Effets neurobiologiques

1. Cibles moléculaires

En absence de toutes drogues, les transporteurs membranaires permettent aux monoamines extracellulaires de réintégrer la terminaison présynaptique où elles seront soit dégradées par les monoamines oxydases A et B, soit à nouveau stockées dans des vésicules de sécrétion dans le but d'une prochaine utilisation. Dans les deux cas, le neurone se retrouve protégé contre les effets toxiques induits par l'oxydation des monoamines présentes en grande quantité dans l'espace synaptique. Cet équilibre est perturbé par les psychostimulants.

i. Mode d'action de la cocaïne

La cocaïne agit principalement en se fixant sur les transporteurs membranaires de monoamines, inhibant leur fonctionnement et empêchant ainsi la recapture de la dopamine

(DA), de la sérotonine et de la noradrénaline par le neurone présynaptique. Par conséquent, il y a une augmentation des neurotransmissions dopaminergique, noradrénergique et sérotoninergique (Ritz et al, 1987 ; Giros et al, 1996 ; Broderick et al, 2003). Cette augmentation a notamment été observée, par microdialyse chez le rat, dans le cortex préfrontal (CPF), le noyau caudé putamen (CPu), le noyau accumbens (NAc) et l'aire tegmentale ventrale (ATV) (Di Chiara and Imperato, 1988; Maisonneuve et al., 1990; Reith et al., 1997). De plus, il a été montré que l'administration aigue de cocaïne chez le rat diminuait la synthèse de la DA et de la sérotonine dans plusieurs régions cérébrales telles que le CPF, le NAc, le CPu et l'amygdale basolatérale (BLA) (Baumann et al., 1993).

ii. Mode d'action de la METH

Comme la cocaïne, la METH induit une augmentation des concentrations extracellulaires de la DA et de la sérotonine (Seiden et al., 1993). Mais, contrairement à la cocaïne qui agit principalement en bloquant les transporteurs membranaires de recapture de monoamines, la METH peut pénétrer dans la terminaison présynaptique soit par diffusion passive à travers la membrane plasmique grâce à son caractère lipophile, soit par transport actif en se liant aux transporteurs membranaires notamment les transporteurs de DA (DAT) (Giros et al, 1996). Elle induit alors une augmentation de la libération de monoamines dans la fente synaptique. Plusieurs modèles permettent d'expliquer le mécanisme d'inversion du transport de la DA par le DAT. En 1979, et grâce à des études visant à identifier les mécanismes d'action de l'AMPH, Fischer et collaborateurs ont établi un modèle « d'échange par diffusion » selon lequel le transport de l'AMPH à l'intérieur de la terminaison présynaptique par le DAT favorise la liaison de la DA intracellulaire à ces transporteurs et, en conséquence, la sortie extracellulaire de DA (Fischer and Cho, 1979). Selon un autre modèle, dit modèle « de déplétion vésiculaire », la concentration intracellulaire de DA serait à l'origine du transport inverse assuré par les DATs (Sulzer et al., 1995). Une fois dans le cytosol, et grâce à sa similarité structurale avec la DA, l'AMPH pénètre dans les vésicules synaptiques, où elle modifie le gradient de concentration. Aussi la METH modifie la distribution des transporteurs vésiculaires de monoamines de type 2 (VMAT-2) de façon à diminuer leur disponibilité pour stocker les monoamines dans les vésicules de stockage

(Fumagalli et al., 1999; Hogan et al., 2000; Riddle et al., 2002). Ces phénomènes induisent une diminution de la recapture vésiculaire et favorisent une accumulation cytoplasmique de DA. Fonctionnant selon un gradient de concentration, les DATs assurent alors la libération de la DA dans la fente synaptique. C'est ainsi que la METH induit une augmentation directe des concentrations extracellulaires de DA. Cet effet est responsable de l'importante neurotoxicité provoquée par la METH *(cf. chapitre 1-II. Toxicité de la METH)*.

2. Circuits neuronaux impliqués dans les effets récompensants des psychostimulants

Bien qu'elles varient en fonction des effets comportementaux et pharmacologiques qu'elles engendrent, les drogues d'abus ont en commun la capacité d'induire une sensation de plaisir (Robinson et Berridge, 2003). Ces effets sont aussi observés dans le cadre de renforçateurs naturels tels que la nourriture. En partant de cette observation, il a été suggéré que les drogues d'abus affectent un système de récompense, normalement impliqué dans le contrôle de la motivation pour les récompenses naturelles telles que la nutrition et l'activité sexuelle (Robinson et Berridge, 2003). Ce système présente des neuroadaptations induites par une prise chronique de drogues qui pourraient fournir l'état motivationnel nécessaire pour la mise en place de l'addiction. Il regroupe deux circuits majeurs : le système dopaminergique mésocorticolimbique et le circuit de l'amygdale étendue (Figure 4).

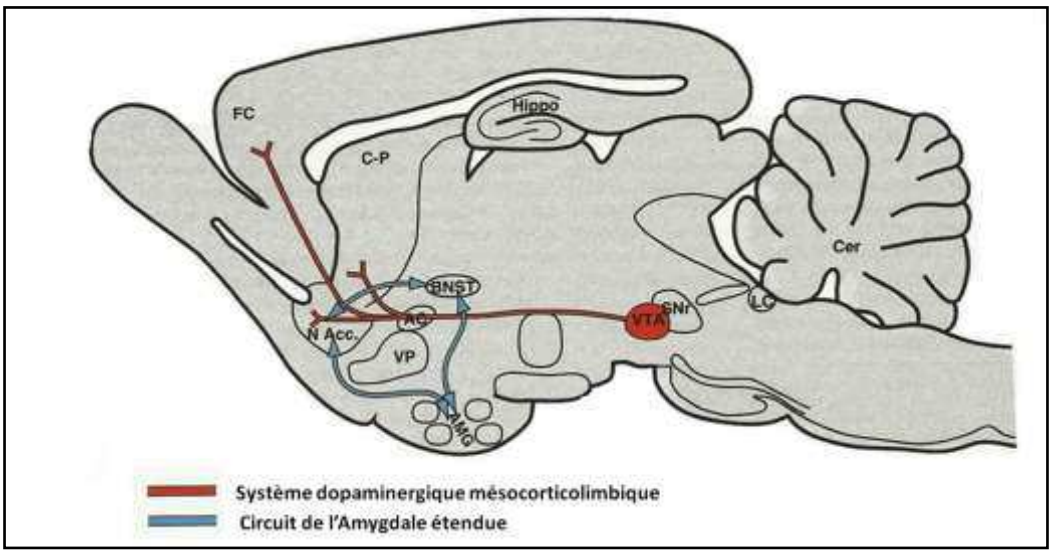


Figure 4. Schéma représentatif des circuits neuronaux impliqués dans les effets renforçants des psychostimulants chez les rongeurs.

La cocaïne et la METH induisent la libération de DA dans le noyau accumbens, le cortex et l'amygdale via une action directe sur les terminaisons dopaminergiques. En rouge est représenté le système dopaminergique mésocorticolimbique. En bleu est représenté le circuit de l'amygdale étendue. *(modifiée d'après (Koob and Le Moal, 2006))*

FC : cortex frontal ; C-P : noyau caudé putamen ; N Acc. : noyau accumbens ; VP : Pallidum ventral ; AC : commissure antérieure ; AMG : amygdale ; Hippo : hippocampe ; VTA : aire tegmentale ventrale ; SNr : substance noire pars reticulata ; LC : locus coeruleus ; Cer : cervelet.

i. Description du système dopaminergique mésocorticolimbique

Le système dopaminergique mésocorticolimbique est constitué des neurones issus de l'ATV et qui projettent vers (i) des structures télencéphaliques notamment le NAc, (ii) des régions corticales comme le CPF, et (iii) des structures du système limbique telles que l'amygdale (Figure 5). Du fait de ces projections, cette voie est impliquée dans la régulation des processus moteurs, affectifs, cognitifs, attentionnels et mnésiques (pour revue (Feltenstein and See, 2008)). Elle est aussi impliquée dans la motivation pour les récompenses naturelles comme la nutrition, la vie socio-affective et l'activité sexuelle (Robinson and Berridge, 2003).

L'**ATV** sous-tend l'effet des renforçateurs naturels ainsi que les propriétés renforçantes des drogues d'abus (Robbins and Everitt, 1996; Koob and Le Moal, 1997). Elle est constituée principalement des neurones dopaminergiques qui projettent vers le NAc et le CPF. L'activité de ces neurones est régulée par (1) les neurones GABAergiques présents dans l'ATV, (2) les afférences excitatrices glutamatergiques en provenance du CPF, et (3) les afférences inhibitrices GABAergiques en provenance du NAc (pour revue : (White, 1996)).

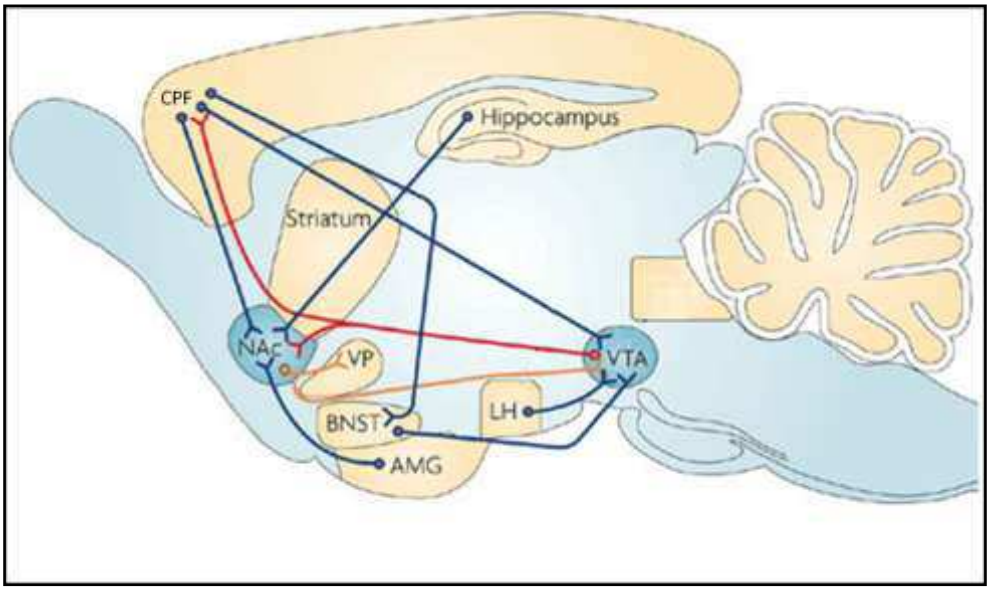


Figure 5. Schéma simplifié de la voie mésocorticolimbique chez les rongeurs.
Les neurones dopaminergiques issus de l'aire tegmentale ventrale (ATV) projettent vers le noyau accumbens (Nac) et le cortex préfrontal (CPF) (rouge). Ces neurones sont contrôlés par les systèmes glutamatergiques (bleu) et GABAergiques (orange). Les neurones glutamatergiques proviennent du CPF, de l'amygdale, de l'hippocampe et du Bed Nucleus of the Stria Terminalis (BNST), et projettent notamment vers le Nac et l'ATV. Les neurones GABAergiques sont issus du NAc et projettent vers l'ATV. *(Kauer and Malenka, 2007)).*
CPF : cortex préfrontal ; NAc : noyau accumbens ; VP : pallidum ventral ; BNST : bed nucleus of the stria terminalis ; LH : hypothalamus latéral ; VTA : aire tegmentale ventrale.

Le **NAc** est une structure cérébrale située dans la partie ventrale du striatum. Sur les plans morphologique et fonctionnel, il peut être divisé en deux sous-régions : le core et le shell (Di Chiara, 2002). Il reçoit majoritairement des afférences dopaminergiques provenant de l'ATV, des afférences excitatrices glutamatergiques provenant du CPF, du cortex cingulaire antérieur, de l'amygdale et de l'hippocampe et envoie des projections inhibitrices GABAergiques vers la substance noire et l'ATV (pour revue : (White, 1996)). Ces connexions

lui confèrent le rôle d'intégrateur des informations sensorielles, affectives et cognitives associées à la prise de drogue, lui permettant d'évaluer les effets renforçants et de déclencher les réponses locomotrices (Koob and Le Moal, 1997).

ii. Description du circuit de l'amygdale étendue

Il existe un substrat anatomique commun aux effets récompensants induits par les drogues et les affects négatifs impliqués dans la mise en place d'une consommation compulsive de drogues. Cette entité neuroanatomique est l'« amygdale étendue ». Elle est constituée d'un continuum de structures télencéphaliques regroupant le Shell du NAc, le noyau du lit de la strie terminale (BNST : Bed Nucleus of the Stria Terminalis) et le noyau central de l'amygdale (CeA) (pour revue (Alheid, 2003)). Ces trois régions partagent des similarités au niveau architecture et connectivité. L'amygdale étendue reçoit des afférences provenant des structures limbiques telles que l'hippocampe et la BLA, et envoie des efférences vers la partie médiane du pallidum ventral, l'ATV et l'hypothalamus latéral (pour revue (Alheid, 2003)). Grâce à ces connections, l'amygdale étendue constitue une interface entre les structures limbiques impliquées dans la régulation des émotions et le système moteur extrapyramidal. Par ailleurs, l'amygdale étendue contient plusieurs systèmes neurochimiques associés aux effets renforçants des drogues d'abus (ex. dopamine et peptides opioïdes), ainsi que des composants de l'axe HPA et des systèmes du stress (ex. GABA, CRF et dynorphine) (Koob and Le Moal, 2005). Ainsi, elle représente un centre d'intégration des processus hédoniques et des processus du stress, produisant un état émotionnel sous-tendant le renforcement négatif induit par les drogues d'abus (Koob and Volkow, 2010).

iii. Interactions des psychostimulants avec le circuit de la récompense

Les neurones dopaminergiques situés dans l'ATV et projetant vers le NAc, en particulier le Shell, sont activés par l'administration de drogues d'abus et leur activation sous-tend les effets récompensants de ces drogues. Premièrement, durant l'auto-administration de cocaïne, une augmentation de la libération de DA est détectée dans le NAc

grâce à la microdialyse *in vivo* (Di Chiara and Imperato, 1988). Deuxièmement, une destruction sélective des neurones dopaminergiques mésocorticolimbiques ou une lésion spécifique des fibres dopaminergiques dans le NAc, induites par la toxine 6-hydroxydopamine (6-OHDA), éliminent le comportement d'auto-administration de cocaïne (Roberts et al., 1980). Par ailleurs, il a été montré que les rats s'autoadministrent l'AMPH (Ikemoto et al., 2005) et la cocaïne (Ikemoto, 2003) dans le Shell, et non dans le core, du NAc. L'administration aigue de la plupart des drogues d'abus induit également une augmentation des concentrations extracellulaires de DA dans le Shell du NAc (Pontieri et al., 1995). Le Shell semble donc être plus important que le core dans la récompense aux drogues. Des études pharmacologiques ont permis de démontrer que les effets récompensants induits par la cocaïne font intervenir les récepteurs dopaminergiques D1 et D2, puisque (1) l'administration d'antagonistes du récepteur D1 directement dans le Shell du NAc diminue le comportement d'auto-administration de cocaïne (Caine et al., 1995) et (2) l'administration de l'eticlopride, un antagoniste du récepteur D2, diminue l'auto-administration de cocaïne chez le singe (Bergman et al., 1990).

3. Interactions des psychostimulants avec les systèmes neuronaux impliqués dans la réponse au stress

Pour un grand nombre de personnes dépendantes, l'addiction peut ne pas être la seule pathologie engendrée par la consommation de drogues. En effet, des syndromes de dépression et d'anxiété y sont le plus fréquemment associés. Selon les études épidémiologiques, 20 à 50% des personnes dépendantes à l'alcool, la cocaïne et les autres psychostimulants présentent aussi des symptômes dépressifs et/ou anxieux (Kreek et al., 2005). En partant de ce constat, de nombreuses études se sont intéressées à l'interaction entre la consommation de cocaïne et l'état de stress des individus, et ont permis de mettre en évidence que la cocaïne et le stress font intervenir les mêmes systèmes hormonaux et neurochimiques. Je présenterai, dans cette partie, l'effet des psychostimulants sur deux systèmes majeurs impliqués dans la réponse au stress : (1) l'axe hypothalamo-hypophyso-

surrénalien, plus couramment connu sous le nom d'axe HPA, et (2) le neuropeptide corticotropin releasing factor (CRF).

i. L'axe HPA : principal système physiologique de réponse au stress.

L'axe HPA est le principal système physiologique de réponse au stress et de régulation de l'homéostasie de l'organisme. Comme son nom l'indique, il est constitué de trois niveaux (Figure 6): (1) le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (PVN : paraventricular nucleus), qui contient des neurones exprimant le CRF, et forme un lien entre le système nerveux et le système endocrinien grâce aux projections qu'il envoie vers l'hypophyse ; (2) l'hypophyse, qui est située à la base du cerveau et est divisée en deux lobes : l'adénohypophyse (hypophyse antérieure) et la neurohypophyse (hypophyse postérieure) ; (3) les glandes surrénales, situées au-dessus des reins, et divisées en médullosurrénale et corticosurrénale. Quand un élément stressant survient, le PVN libère le CRF dans le système porte hypothalamo-hypophysaire. Cette neurohormone atteint l'hypophyse, où elle induit la synthèse et la sécrétion de l'hormone corticotrope (ACTH, Adreno CorticoTropic Hormone). L'ACTH est véhiculée par le sang jusqu'aux glandes corticosurrénales où elle induit la libération de glucocorticoïdes (cortisol chez les primates et corticostérone chez les rongeurs). A leur tour, ces hormones ont la capacité de réguler l'activité de l'axe HPA , par rétrocontrôle négatif, au niveau de différentes structures cérébrales, telles que l'hippocampe et l'amygdale (pour revue (Nestler et al., 2002)).

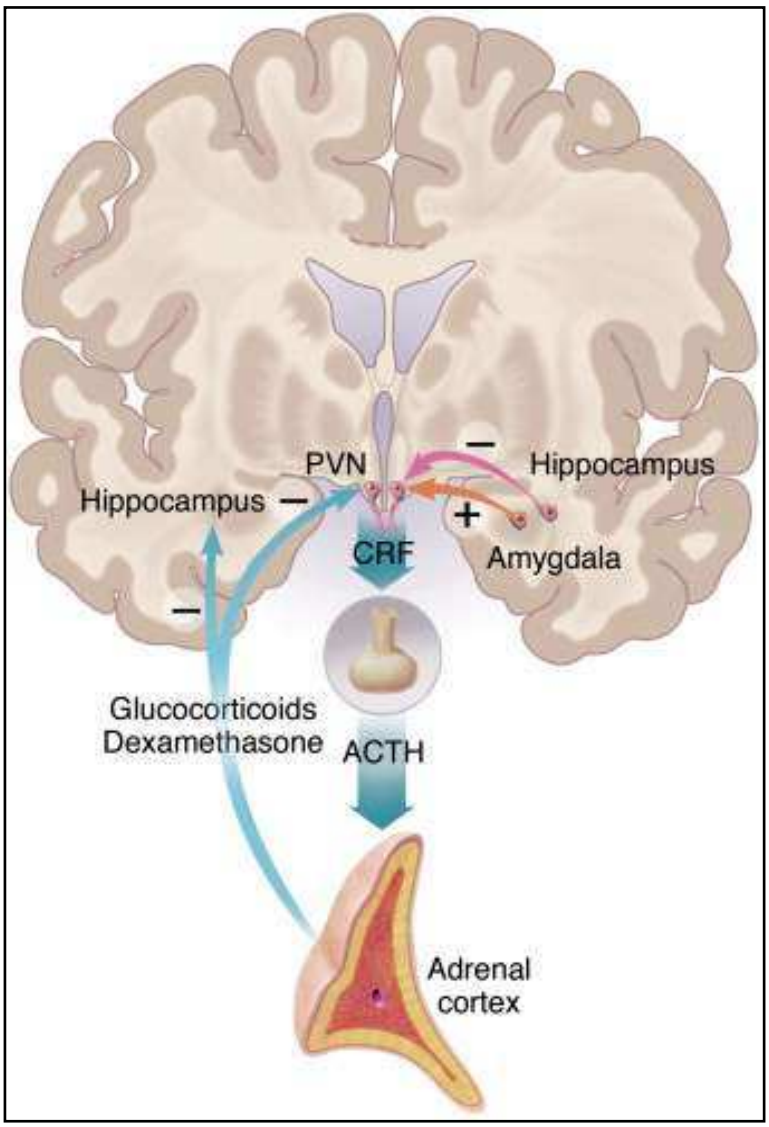


Figure 6. L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (axe HPA) chez l'Homme.
Les glucocorticoïdes contrôlent l'activité de l'axe HPA grâce aux afférences neuronales excitatrices, provenant de l'amygdale, et inhibitrices, provenant de l'hippocampe. (*d'après Nestler et al., 2002)*

Dans le cadre de la recherche sur la dépendance aux drogues, il a été montré que l'administration aigue de psychostimulants, chez l'Homme et les rongeurs, produit une activation de l'axe HPA semblable à celle induite par le stress (pour revue (Sarnyai et al., 2001)). En effet, chez l'Homme, l'administration aigue de cocaïne par voie intraveineuse induit une augmentation du taux sanguin de cortisol chez des sujets ayant déjà consommé la drogue (Baumann et al., 1995), ainsi que chez des sujets naïfs (Heesch et al., 1995). Chez les

rongeurs, une injection locale de cocaïne au niveau de l'hypothalamus (Saphier et al., 1993) ou du striatum (Ikemoto and Goeders, 1998) induit une activation de l'axe HPA, mesurée par une augmentation des niveaux sanguins de corticostérone. Cette activation dépend des récepteurs du CRF, puisque l'administration centrale d'antagoniste du récepteur CRF bloque l'augmentation de corticostérone chez des rats ayant reçu de la cocaïne (Sarnyai et al., 1992). Par ailleurs, l'administration chronique de psychostimulants induit une hyperactivité soutenue de l'axe HPA même après l'arrêt des prises de drogue : comparés à des rats naïfs, des rats ayant subi 3 à 6 semaines de « binge » (c'est-à-dire des épisodes de prise, répétés et rapprochés) de cocaïne présentent une augmentation du poids des glandes surrénales et du taux basal de corticostérone, 12h après la dernière injection reçue (Sarnyai et al., 1998). De manière intéressante, l'inverse est observé dans un protocole d'auto-administration de cocaïne : 24h après l'arrêt de la prise de drogues, les rats présentent une diminution du taux basal de corticostérone associée à une augmentation de la densité des récepteurs aux glucocorticoïdes dans l'hippocampe (Mantsch and Goeders, 2000).

ii. Le système du CRF : un neuropeptide impliqué dans la réponse au stress

Le neuropeptide CRF est largement exprimé dans le cerveau, avec une densité importante dans le PVN, le BNST, le CeA, le locus coeruleus et le noyau du raphé. Du fait de cette distribution, le CRF est impliqué à la fois dans la réponse au stress et dans la dépendance aux drogues d'abus. Il peut se lier à deux types de récepteurs : le récepteur CRF de type 1 (CRF1) et de type 2 (CRF2). Le récepteur CRF1 a une expression centrale et est très exprimé au niveau de l'hypophyse, tandis que le récepteur CRF2 présente une densité plus importante au niveau périphérique, et est exprimé dans certaines structures cérébrales telles que le septum, l'hypothalamus et le noyau du Raphé (pour revue (Arborelius et al., 1999)).

Comme l'administration, aigue ou chronique, de cocaïne active l'axe HPA de manière dépendante du système CRF (Sarnyai et al., 1992), les chercheurs se sont intéressés à savoir

si la cocaïne peut moduler le système du CRF. Il a ainsi été démontré que l'administration aigue de cocaïne à des rats induit une diminution de la concentration de CRF dans l'hypothalamus, le NAc, l'hippocampe et le cortex frontal, mais pas dans l'amygdale, où une augmentation de CRF a été observée (Sarnyai et al., 1993). De même, dans une étude de microdialyse *in vivo*, Richter et collaborateurs ont trouvé que l'administration répétée de cocaïne induit une augmentation de la synthèse et de la libération de CRF dans le CeA (Richter et al., 1995). Par ailleurs, le CRF est exprimé dans des régions appartenant au système dopaminergique mésocorticolimbique (NAc, cortex frontal) et à l'amygdale étendue (BNST, CeA, NAc). De ce fait, outre son action de régulateur des réponses hormonales induites par les facteurs stressants, le système CRF peut être engagé dans différents aspects de la dépendance aux drogues d'abus. L'arrêt de consommation de certaines drogues, telles que l'alcool, induit une augmentation de la libération de CRF dans la CeA et le BNST (Funk et al., 2006). De plus, l'injection d'antagoniste du CRF au niveau de l'amygdale bloque les effets anxiogènes induits par le sevrage à la cocaïne (pour revue (Sarnyai et al., 1998)), et l'administration d'antagonistes du CRF dans le BNST permet de bloquer la rechute induite par le stress pour la cocaïne et l'héroïne (Shaham et al., 1998).

D- Dépendance aux psychostimulants

1. Description de la dépendance

i. Diagnostic

La dépendance aux drogues est un désordre chronique caractérisé par (1) une recherche compulsive de la drogue, (2) une perte de contrôle de la prise, et (3) l'émergence d'un état émotionnel négatif quand la drogue n'est pas accessible (Koob and Le Moal, 1997). De nos jours, le diagnostic de dépendance à une drogue d'abus se base sur les critères du DSM-IV (Diagnostic and Statistical manual of Mental disorders - 4ème édition ; *American Psychiatric Association, 1994*) (Tableau 1) et du CIM-10 (Classification statistique Internationale des Maladies et des problèmes de santé connexes – 10ème édition ; *Organisation Mondiale de la Santé, 1992*) (Tableau 2).

Tableau 1. Critères de la dépendance selon le DSM-IV

La dépendance est une utilisation inappropriée d'une drogue entraînant une altération du fonctionnement ou une souffrance, cliniquement significative, et caractérisée par l'apparition d'**au moins trois des symptômes** cités ci-dessous et cela sur une période d'un an :

1- Une tolérance caractérisée soit par une augmentation des doses consommées afin d'obtenir un effet similaire, soit par une diminution de l'effet induit en cas d'utilisation répétée d'une même dose.
2- Sevrage caractérisé soit par l'apparition d'un syndrome de sevrage suite à l'arrêt de consommation de la drogue, soit par la prise de la même substance (ou d'une substance apparentée) dans le but de soulager ou d'éviter les symptômes de sevrage.
3- Substance souvent prise en quantité supérieure ou pendant un laps de temps plus long que ce que la personne a envisagé.
4- Un désir persistant pour diminuer ou arrêter la prise de drogue
5- Un temps de plus en plus important est consacré à la recherche de la drogue
6- Abandon des activités professionnelles et sociales à cause de l'utilisation de la drogue
7- Une poursuite de la consommation de la drogue, malgré la conscience des problèmes qu'elle engendre

DSM-IV : Diagnostic and Statistical manual of Mental disorders - 4ème édition ; American Psychiatric Association, 1994

Tableau 2. Critères de la dépendance selon le CIM-10

Le diagnostic d'une dépendance nécessite l'apparition d'**au moins trois des manifestations suivantes**, en même temps, au cours de la dernière année :

1- Désir puissant ou compulsif d'utiliser une substance psychoactive
2- Difficultés à contrôler l'utilisation de la substance (début ou interruption de la consommation au niveau de l'utilisation)
3- Emergence d'un syndrome de sevrage physiologique quand le sujet diminue ou arrête la consommation d'une substance psychoactive, comme en témoignent la survenue d'un syndrome de sevrage caractéristique de la substance, ou l'utilisation de la même substance (ou d'une substance apparentée) pour soulager ou éviter les symptômes de sevrage
4- Mise en évidence d'une tolérance aux effets de la substance psychoactive : le sujet a besoin d'une quantité plus importante de la substance pour obtenir l'effet désiré
5- Désintérêt progressif pour toute autre activité au profit de l'utilisation de la substance psychoactive, et augmentation du temps passé à se la procurer, la consommer ou récupérer ses effets
6- Poursuite de la consommation de la substance malgré ses conséquences nocives.

CIM-10 : Classification statistique Internationale des Maladies et des problèmes de santé connexes – 10ème édition ; Organisation Mondiale de la Santé, 1992

ii. Vulnérabilité

Nombreuses sont les personnes qui expérimentent les drogues mais 15 à 20% seulement en deviennent dépendantes (Piazza and Le Moal, 1996). Cette dépendance est caractérisée par une prise de drogues de façon compulsive et non contrôlée. Le passage d'une prise de drogue contrôlée à une prise compulsive est le résultat d'interactions complexes entre trois principaux facteurs rendant un individu « vulnérable » aux effets addictifs d'une drogue (Kreek et al., 2002) (Figure 7).

(1) *les déterminants génétiques* : l'héritabilité de certaines addictions a été mise en évidence grâce à des études épidémiologiques réalisées auprès de jumeaux et de personnes adoptées (Johnson et al, 1996). Aussi, des études de génome ont montré que les personnes ayant l'allèle (A1) du gène codant pour le récepteur dopaminergique D2 aurait un risque élevé de prédisposition à l'addiction à l'alcool (Blum et al., 1990). Par ailleurs, le passage aux modèles animaux a permis de sélectionner des souches de rongeurs en fonction de s'ils s'autoadministrent facilement ou pas les drogues (Kosten et al., 1997 ; Brodkin et al., 1998). De plus, des études réalisées chez des souris knock-out pour le transporteur dopaminergique (DAT) ont montré que, contrairement à des souris wild type, les souris KO ne présentent pas d'augmentation de l'activité locomotrice en réponse aux psychostimulants (Giros et al., 1996).

(2) *les effets induits par les drogues* : Quand elles sont consommées de façon chronique, les drogues induisent des neuroadaptations moléculaires et cellulaires (pour revue (Vanderschuren and Kalivas, 2000)) qui joueraient un rôle primordial dans la transition d'un usage occasionnel à une prise compulsive de drogues d'abus. Ces neuroadaptations ont pour cible principale le système de récompense qui est impliqué dans la motivation pour les récompenses naturelles (Robinson and Berridge, 2003). Les comportements dirigés vers la prise de drogue sont alors renforcés au détriment des comportements naturels, entraînant ainsi un état pathologique chronique (Kalivas and O'Brien, 2008). Ces mécanismes adaptatifs sont développés dans la partie suivante de ce chapitre.

(3) *les facteurs environnementaux* : De nombreuses études ont permis de mettre en évidence l'influence des expériences de vie sur la sensibilité des individus aux drogues d'abus. Ainsi, des conditions de vie négatives (avoir de pauvres relations familiales et sociales, avoir un faible statut socio-économique, avoir déjà été exposé à un stress important…) constitueraient des facteurs de risque de développement de dépendance (McEwen, 2000; Goeders, 2002; McEwen, 2007), tandis que des expériences de vie positives (niveau d'études élevés, très bonnes relations familiales, bon statut socio-économique…) seraient des facteurs de protection contre l'apparition d'une dépendance aux drogues (Jessor and Jessor, 1980). Tous ces facteurs vont pouvoir moduler le cerveau et rendre ainsi l'individu plus ou moins vulnérable aux drogues d'abus. Le chapitre 2 de ce manuscrit de thèse est consacré à ces facteurs environnementaux.

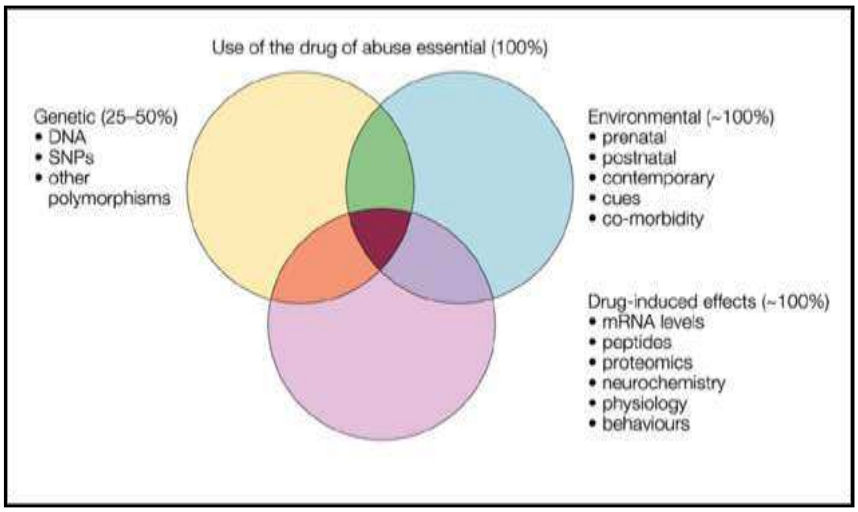


Figure 7. L'interaction entre les facteurs génétiques, environnementaux et associés à la drogue permet d'évaluer la vulnérabilité au développement de l'addiction.
Les facteurs associés à la drogue regroupent les changements induits par la drogue sur le taux d'ARNm (mRNA levels) et le protéome en général ; s'ajoutent à cela les facteurs environnementaux, comme le stress et les expériences passées, et le patrimoine génétique de l'individu (SNP : Single Nucleotide Polymorphism). *(d'après Kreek et al, 2002)*

2. Mécanismes impliqués dans la dépendance

Comme nous l'avons décrit précédemment, l'administration de psychostimulants active la neurotransmission dopaminergique *(cf. partie 1.C- Effets neurobiologiques),* et

glutamatergique dans le NAc, l'hippocampe, l'ATV et la substance noire (SN) (Kalivas and Duffy, 1995; Smith et al., 1995). Cette libération de glutamate serait dépendante des récepteurs dopaminergiques D1 (Kalivas and Duffy, 1995) et est régulée par une boucle de rétrocontrôle striatothalamocortical (Kalivas and Duffy, 1995; Mark et al., 2004). En effet, une augmentation de l'activité des récepteurs dopaminergiques D1 présents au niveau des terminaisons striatales présynaptiques provoquerait une stimulation du système GABA nigrostriatal. Il y a alors augmentation de la libération de GABA dans la SN pars reticulata, induisant une inhibition du signal GABA dans le système nigrothalamique, et donc désinhibition des afférences thalamocorticales. D'où l'augmentation de la libération de glutamate dans le striatum (Mark et al., 2004) (Figure 8).

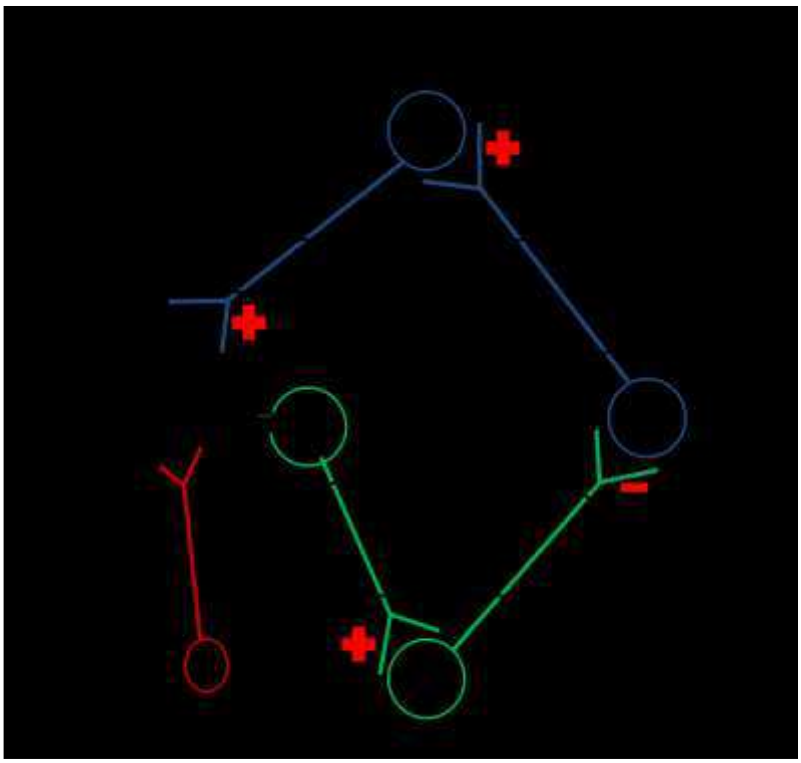


Figure 8. Boucle striato-thalamocorticale impliquée dans la régulation du système glutamatergique.
Une augmentation de l'activité des récepteurs dopaminergiques D1 (1), présents au niveau des terminaisons striatales présynaptiques, provoquerait une stimulation du système GABA nigrostriatal. Il y a alors augmentation de la libération de GABA dans la substance noire pars reticulata (2), induisant une inhibition du signal GABA dans le système nigrothalamique (3), et, par conséquent, une désinhibition des afférences thalamocorticales (4). D'où l'augmentation de la libération de glutamate dans le striatum (5). *(d'après Mark et al., 2004)*

Dans le NAc, les récepteurs dopaminergiques, D1-like et D2-like, et glutamatergiques, AMPA (α-amino-3-hydroxy-5methylisoazol-4-propionate) et NMDA (N-Methyl-D-Aspartate), constituent des cibles principales pour ces modifications de neurotransmission (pour revue (Hyman, 1996)). L'activation de ces récepteurs, exprimés par le neurone postsynaptique, active une cascade de signalisation intracellulaire associée à l'AMP cyclique (AMPc) (pour revue (Nestler and Aghajanian, 1997)), régulant ainsi l'activité de plusieurs protéines kinases. Ces kinases ont la capacité (1) de modifier la fonction des protéines cytoplasmiques, membranaires (ex. les canaux ioniques) et nucléaires, (2) de phosphoryler des facteurs de transcription tels que CREB (cAMP Response Element Binding protein) et (3) d'induire l'expression de gènes intermédiaires précoces tels que Fos et Jun (pour revue (Koob et al., 1998)). L'activation de ces facteurs se fait soit par phosphorylation comme c'est le cas du facteur CREB, soit par transcription comme c'est le cas de c-fos. A leur tour, les facteurs de transcription régulent l'expression de gènes codants pour des protéines impliqués dans la transduction du signal (ex. les kinases) ou la neurotransmission (ex. les canaux ioniques), modifiant ainsi, à long terme, la réponse neuronale (Figure 9).

i. Les récepteurs dopaminergiques

La cible principale des psychostimulants est le système dopaminergique *(cf. chapitre 1-C-1 Cibles neurobiologiques)*. Dans le NAc, l'activation de la transmission dopaminergique induit l'activation des récepteurs dopaminergiques membranaires. Ce sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires, couplés à des protéines G (pour revue (Jaber et al., 1996)). Cinq types de récepteurs ont été identifiés (D1 à D5) et classés en deux grandes familles en fonction de leurs homologies. Les récepteurs D1 et D5 appartiennent à la famille des D1-like, sont principalement exprimés par les neurones post-synaptiques et stimulent la voie de l'AMPc. Les récepteurs D2, D3 et D4 forment la famille des D2-like, peuvent être exprimés aux niveaux pré- et post-synaptiques et inhibent la voie de l'AMPc (pour revue (Jaber et al., 1996)).

ii. Les kinases

L'activation des récepteurs D1, suite à l'administration de cocaïne, stimule la cascade de signalisation associée à l'AMPc. Il y a alors activation de la PKA (protéine kinase A). Cette enzyme peut activer d'autres protéines kinases, par phosphorylation, déclenchant ainsi des cascades de protéines-kinases. Parmi les cibles de la PKA se trouve DARPP32 (Dopamine and cAMP Responsive PhosphoProtein 32). L'activation de cette kinase est régulée par les drogues d'abus telles que la cocaïne, l'AMPH et la nicotine, et est indispensable pour l'activation de la protéine ERK (extracellular signal-regulated kinase) dans le striatum (Valjent et al., 2005).

ERK est une kinase appartenant à la famille des MAP kinases (Mitogen Activated Protein kinases), qui interviennent dans la régulation du fonctionnement cellulaire, en particulier dans les neurones, mais aussi dans la dépendance aux psychostimulants. Une augmentation de la phosphorylation de ERK a été observée, dans les neurones épineux du striatum, en réponse aux drogues telles que la cocaïne, l'AMPH, la nicotine et la morphine (Valjent et al., 2004). Cette activation induite par les drogues nécessite l'activation simultanée des récepteurs D1 et NMDA (Valjent et al, 2000a). En effet, la stimulation des D1 active DARPP32 qui permet d'inhiber la protéine phosphatase 1. Cela a deux conséquences majeures. La première est l'inhibition de la STEP (striatal enriched phosphatase), responsable de l'inactivation de la kinase ERK. Une deuxième conséquence est l'activation de MEK, une kinase responsable de la phosphorylation de ERK. C'est ainsi que DARPP32 régule l'activation de la kinase ERK (Valjent et al., 2005) (Figure 10).

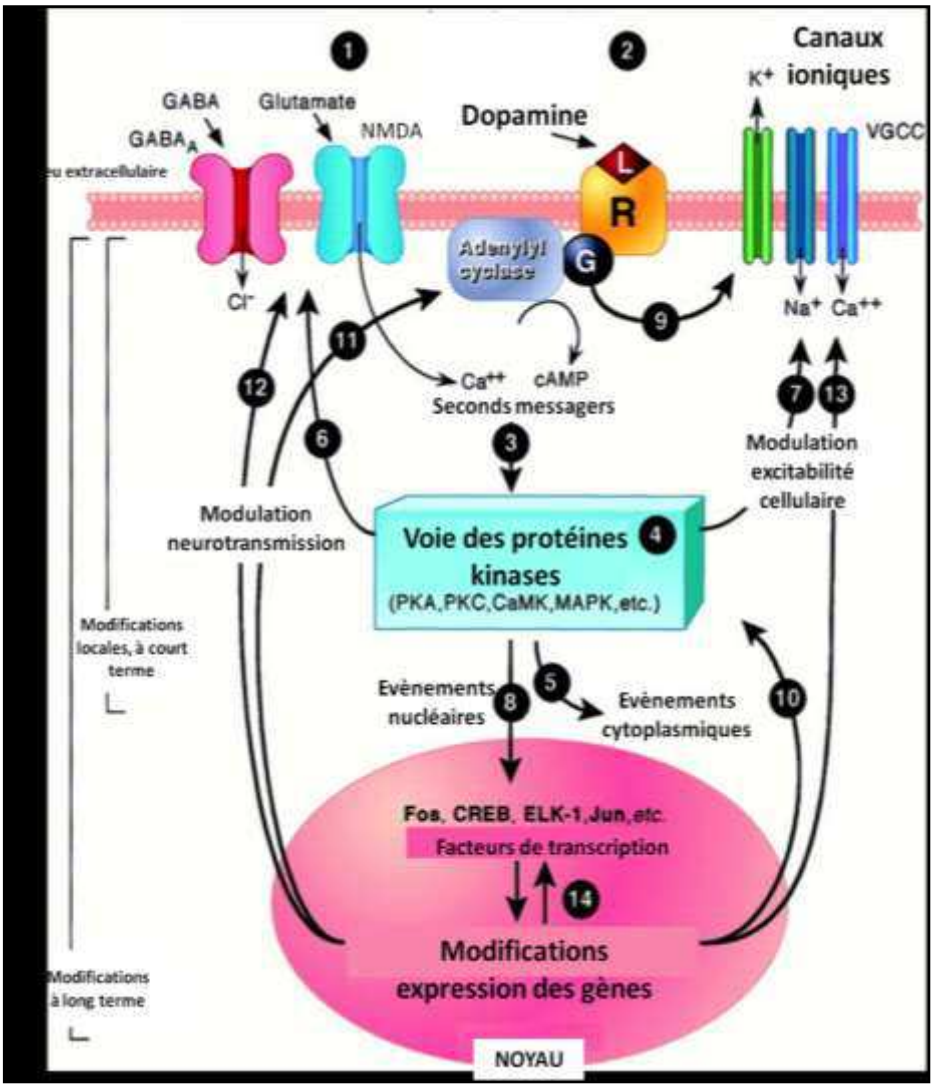


Figure 9. Mécanismes moléculaires intervenants dans les neuroadaptations induites par les drogues d'abus.

Suite à l'activation des récepteurs glutamatergiques (1) ou dopaminergique (2) le taux des seconds messagers, Ca^{2+} et AMPc, augmente (3). Il y a activation de kinases (4) capables de modifier la fonction des protéines cytosoliques (5), membranaires (6) et la perméabilité des canaux ioniques (7). Ces kinases peuvent aussi induire des modifications à long terme, en activant des facteurs de transcription (8) qui, à leur tour, régulent l'expression de gènes codants pour des protéines impliquées dans la transduction du signal (10), la modulation de la neurotransmission (11,12) et la modulation de l'excitabilité cellulaire (13). Une exposition chronique aux drogues d'abus peut modifier l'expression des facteurs de transcription (14). *(modifiée d'après (Koob et al., 1998))*

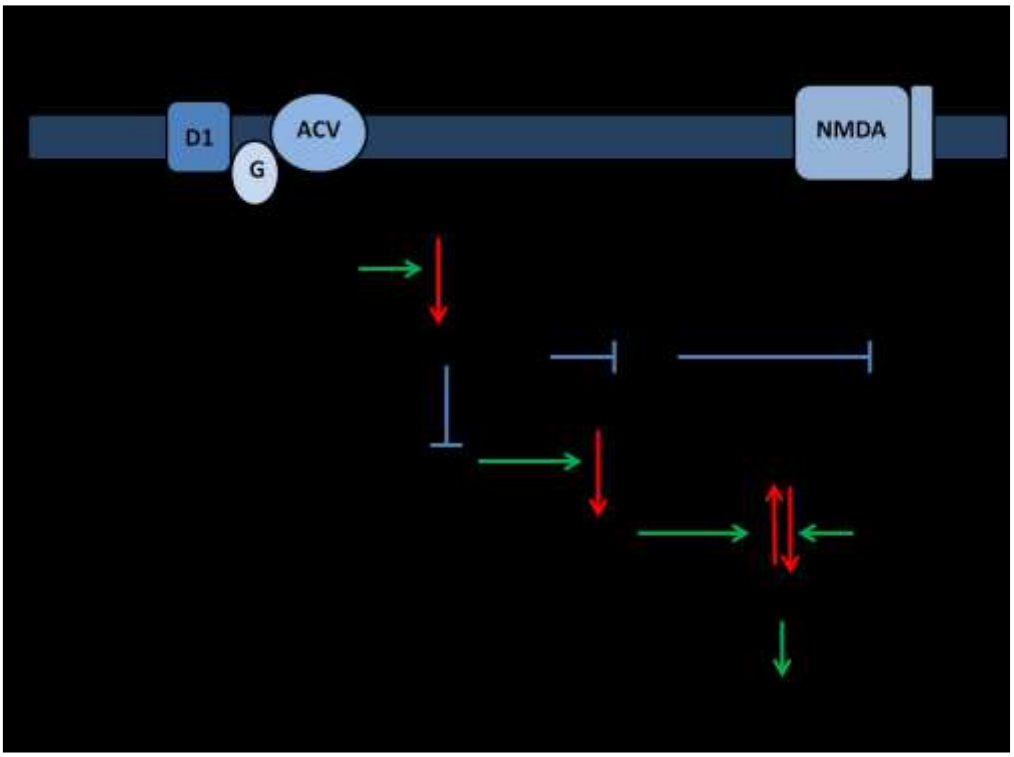


Figure 10. Représentation de la régulation de la stimulation de ERK par les kinases et les phosphatases suite à une administration aigue de psychostimulants. PP1 : protéine phosphatase 1 ; STEP : striatal enriched phosphatase *(d'après Valjent et al., 2005)*

De plus, l'activation de la protéine ERK semble indispensable à la mise en place des effets comportementaux des drogues (pour revue : (Girault et al., 2007)) puisqu'une inhibition de la phosphorylation de ERK empêche l'induction d'une préférence de place conditionnée associée à la cocaïne (Valjent et al., 2000a), ainsi que le développement d'une sensibilisation comportementale (augmentation progressive de la réponse comportementale induite par l'administration répétée d'une même dose de drogue) en réponse aux psychostimulants (Valjent et al., 2005; Valjent et al., 2006).

iii. Les facteurs de transcription : exemple de CREB

Une fois activées, ces kinases vont pouvoir, à leur tour, activer des facteurs de transcription constitutifs situés dans le cytoplasme et qui, une fois phosphorylés, migrent

dans le noyau et régulent l'expression de différents gènes. Un facteur de transcription qui a été largement étudié à la fois dans la dépression et dans l'addiction aux drogues est CREB.

CREB est un facteur de transcription qui agit en se liant sous forme de dimère à un site CRE (cAMP Response Element) présent dans la région régulatrice de différents gènes et déclenche ainsi leur transcription (pour revue (Carlezon et al., 2005)). L'activation ou l'inhibition de CREB se fait via une phosphorylation de deux sérines différentes. La phosphorylation de la sérine 133 par la PKA, les messagers intracellulaires associés au Ca^{2+} tels que la Calcium Calmoduline kinase IV (CaMK IV) ou les MAP kinases telles que les RSK (MAP activated ribosomal S6 kinases), induit une activation de CREB. Il y a alors recrutement de la CBP (CREB-binding protein) et activation de la transcription des gènes cibles. Quand il est phosphorylé au niveau de la sérine 142, par la CaMK II, le dimère se dissocie et CREB est inactivé (pour revue (Carlezon et al., 2005)). Dans le système nerveux central (SNC), de nombreux gènes ont été identifiés comme présentant un site CRE et donc régulés par CREB. Ces gènes codent pour des neuropeptides (ex. dynorphine), des enzymes de synthèse de neurotransmetteurs (ex. la tyrosine hydroxylaes (TH)), des protéines de signalisation (ex. ERK) et d'autres facteurs de transcription (Nestler, 2001).

L'implication de CREB dans la facilitation de la fonction mnésique et l'apprentissage (Carlezon et al., 2005) a amené plusieurs équipes de recherche à s'interroger sur l'implication de CREB dans la dépendance aux drogues d'abus. En effet, suite à une exposition chronique à la cocaïne, CREB s'active, de façon dépendante de l'AMPc, dans des régions cérébrales impliquées dans le système de récompense telles que le NAc, l'ATV, l'amygdale, l'hippocampe et le CPF (Terwilliger et al., 1991; Nestler, 2004). Dans le NAc, par exemple, les études ont montré qu'une augmentation de la phosphorylation de CREB, par activation de la PKA, diminue les effets récompensants de la cocaïne (Self et al., 1998). De même, la surexpression de CREB dans cette région diminue les effets récompensants de la cocaïne dans un modèle de préférence de place conditionnée (CPP) (Carlezon et al., 1998; Barrot et al., 2002), ainsi que la réponse au stress (Barrot et al., 2002). Au contraire, des souris ayant un déficit partiel de CREB (Walters and Blendy, 2001) ou surexprimant CREM, le mutant dominant négatif de CREB (Carlezon et al., 1998), sont plus sensibles aux effets

récompensants de la cocaïne. Ces résultats permettent de mettre en évidence l'implication de CREB dans les aspects motivationnels et récompensants de la drogue. Contrairement au NAc, au niveau de l'ATV, les conséquences de l'activation de CREB varient en fonction de la région dans laquelle il est activé. Ainsi, une surexpression de CREB dans la région rostrale induit une augmentation des effets récompensants de la cocaïne tandis que sa surexpression dans la région caudale est associée à une diminution de ces effets (Olson et al., 2005).

CREB serait aussi impliqué dans les comportements dépressifs. Selon la région cérébrale étudiée, l'activation de CREB peut provoquer des comportements dépressifs ou les diminuer. Dans l'hippocampe, par exemple, CREB semble jouer un rôle important dans la médiation des effets d'un antidépresseur, puisque la majorité des antidépresseurs utilisés augmentent son activité (Nibuya et al., 1996). Cette activation est corrélée à une augmentation de l'expression de facteurs neurotrophiques tels que le BDNF (brain derived neurotrophic factor) (Nibuya et al., 1995). De plus, l'augmentation de l'activation de CREB dans l'hippocampe diminue les comportements dépressifs chez les rongeurs (Thome et al., 2000). Contrairement à l'hippocampe, l'activation de CREB dans le NAc engendre l'effet inverse, c'est à dire induit des comportements dépressif (Newton et al., 2002), alors que la diminution de son activité produit un effet antidépresseur observé dans le test de la nage forcée (Pliakas et al., 2001).

Il a été montré que l'un des gènes régulés par CREB est celui codant pour la dynorphine (Carlezon et al., 2005). L'administration de cocaïne induit l'expression de ce neuropeptide qui, à son tour, induit une diminution de la libération de DA dans le NAc par action sur les récepteurs κ-opioïdes exprimés par les neurones présynaptiques (Hyman, 1996; Carlezon et al., 1998) (Figure 11).

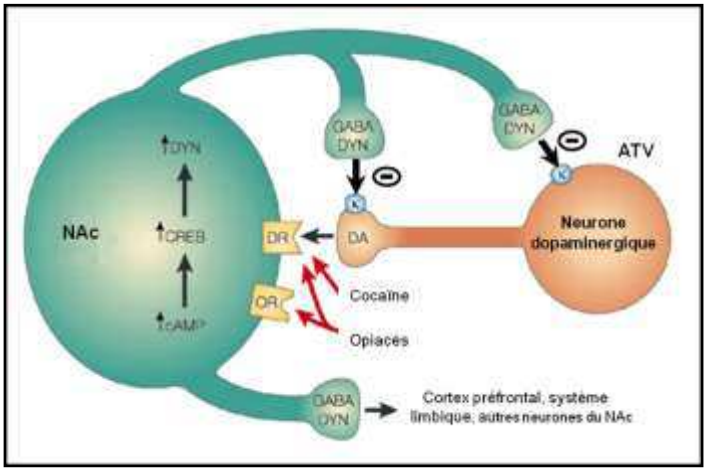


Figure 11. Rétrocontrôle de l'activité des neurones dopaminergiques par la dynorphine.
Suite à une exposition chronique à la cocaïne ou aux opiacés, la voie de l'AMPc est activée. CREB est phosphorylé et régule l'expression de la Dynorphine (DYN), un neuropeptide capable d'exercer un rétrocontrôle négatif sur les neurones dopaminergiques. En se fixant aux récepteurs k exprimés par les terminaisons nerveuses et les corps cellulaires des neurones dopaminergiques, DYN inhibe la libération de DA dans le Nac. *(d'après Nestler, 2001)*

iv. Les gènes à réponse précoce

La régulation de la voie de l'AMPc et l'activation de CREB sont des mécanismes transitoires, qui disparaissent rapidement après l'arrêt de consommation de drogues. Par conséquent, ces changements constituent un relai entre la stimulation cellulaire et la mise en place des changements à long terme produits par les drogues d'abus. En effet, quand ils sont activés, les facteurs de transcription activent les gènes à réponse précoce caractérisés par une expression rapide, transitoire et ne nécessitant pas la synthèse de nouvelles protéines. Parmi les gènes à réponse précoce les plus étudiés dans le cadre de la recherche sur la dépendance aux drogues se trouvent les gènes codant pour les protéines de la famille FOS. L'administration aigue de drogues d'abus induit une activation rapide (1-4h) des membres de la famille FOS, tels que c-Fos, FosB, FRA-1 et FRA-2, dans le NAc et le CPu (Young et al., 1991; Hope et al., 1992). L'instabilité de ces protéines et de leur ARNm font que cette induction est transitoire et disparaît 4 à 12h après l'administration de la drogue. Au contraire, l'isoforme ΔFosB est faiblement induit en administration aigue, mais sa forte stabilité lui permet de s'accumuler dans les neurones suite à des injections répétées de

drogues d'abus (Hope et al., 1992) (Figure 12). Par conséquent, ΔFosB persiste pendant de longues périodes. Ce phénomène a été observé suite à l'administration chronique de plusieurs drogues d'abus dont la cocaïne, l'AMPH, et la nicotine. Cette induction semble être spécifique des neurones épineux moyens exprimant la dynorphine (Kelz and Nestler, 2000). Le rôle de ΔFosB dans la mise en place de l'addiction a été étudié grâce à des souris transgéniques surexprimant la protéine dans le NAc. Ces souris présentent une sensibilité accrue aux effets locomoteurs et récompensants de la cocaïne (Colby et al., 2003), alors que l'expression du dominant négatif de ΔFosB la diminue (Peakman et al., 2003). Le caractère stable de ΔFosB maintient ces changements comportementaux pendant des semaines, voire des mois après la dernière prise de cocaïne (Nestler, 2001). Ainsi, ΔFosB peut être considéré comme étant un « interrupteur » moléculaire permettant l'initiation et le maintien d'un comportement addictif.

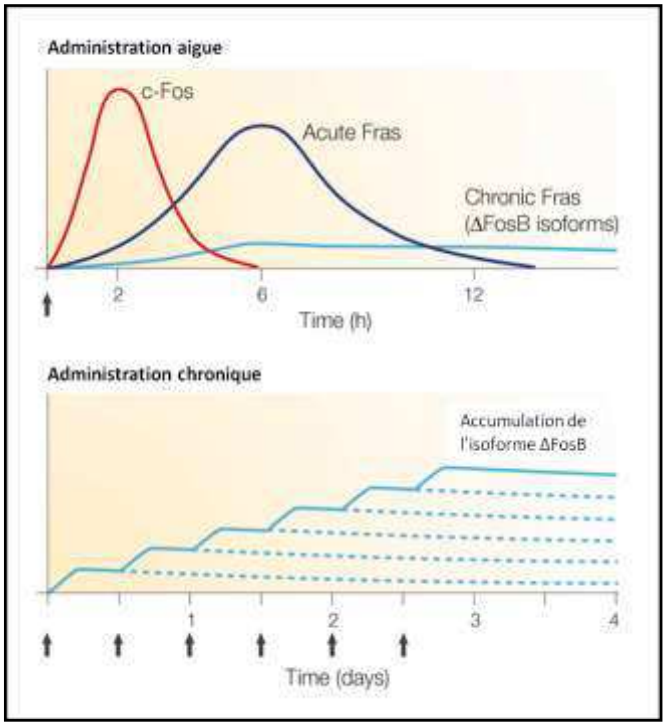


Figure 12. Régulation des protéines de la famille FOS par les drogues d'abus.
L'administration aigue de drogues d'abus induit une activation rapide et transitoire des protéines c-Fos, et FRAs (ex. FosB, FRA-1, FRA-2). Au contraire, ΔFosB est une protéine stable, faiblement induite par exposition aigue aux drogues. Des injections répétées induisent l'accumulation de ΔFosB dans le cerveau. *(d'après Nestler, 2001)*

E- Toxicité induite par la METH

Par ailleurs leur potentiel addictif, et en comparaison à d'autres psychostimulants comme la cocaïne, les AMPH ont la particularité d'induire une forte toxicité neuronale. Ce risque de toxicité est amplifié par le fait que, souvent, les AMPH sont prises dans des « binges ». De plus, les AMPH sont produites de façon artisanale et, de ce fait, les produits obtenus présentent des concentrations de produit actif variables. Enfin, les excipients utilisés dans la production de ce psychostimulant sont des produits toxiques. Pour ces raisons, les effets neurotoxiques des AMPH, et plus particulièrement de la METH, décrits ci-dessous, sont devenus un sujet de recherche autonome.

1. Atteintes neurologiques induites par la METH

i. Atteintes neurologiques chez l'Homme

Chez l'Homme, une consommation chronique de METH induit des dommages neuronaux durables dont une diminution des niveaux des marqueurs dopaminergiques striataux. En effet, une analyse post-mortem sur des cerveaux de personnes ayant consommé de la METH a révélé une diminution de la concentration de DA dans les noyaux caudé (une réduction d'environ 61%) et putamen (une réduction de 50%) (Moszczynska et al., 2004). Une autre analyse post-mortem a permis de mettre en évidence une diminution des niveaux de DAT dans le CPu chez des consommateurs de METH (Wilson et al., 1996). De même, des études de Tomographie par Emission de Positons réalisées chez des consommateurs de METH ont montré une diminution du niveau des DAT (McCann et al., 1998; Volkow et al., 2001b) même après des années d'abstinence (Volkow et al., 2001b; Kita et al., 2009). Cette diminution est corrélée avec les années de consommation et les doses utilisées (Volkow et al., 2001b). Cependant, une étude a montré un rétablissement du niveau de DAT chez des consommateurs de METH après environ 1 an d'abstinence, négativement corrélé avec les années de consommation de la drogue et les doses utilisées (Volkow et al., 2001a-a).

Le VMAT-2 est un marqueur dopaminergique difficilement modulable par les altérations du système dopaminergique mais représente un indicateur de l'intégrité des terminaisons

neuronales. Une diminution du niveau de VMAT-2 a été observée en post-mortem dans des cerveaux de consommateurs de METH (Wilson et al., 1996) tandis qu'une étude en imagerie cérébrale a montré une diminution du taux de VMAT-2 (10-11%) dans le striatum de consommateurs abstinents (Johanson et al., 2006). Aussi, l'activité de la TH, l'enzyme de synthèse de la DA, est réduite chez des consommateurs chroniques de METH (Wilson et al., 1996; Quinton and Yamamoto, 2006).

Tous ces effets de la METH sur l'expression des marqueurs dopaminergiques ont pour conséquence la mise en place de déficits cognitifs, plus ou moins sévères, observés chez des consommateurs chroniques de ce psychostimulant. Ainsi, et en utilisant l'imagerie cérébrale, Sekine et collaborateurs ont mis en évidence une relation entre ces modifications cellulaires, la durée de consommation de la METH et la sévérité des symptômes psychiatriques observés. Comme décrit précédemment, une diminution de la densité des DAT a été observée notamment dans des structures de projection des neurones dopaminergiques : le striatum, l'amygdale, le cortex orbitofrontal et le cortex préfrontal dorsolatéral (Sekine et al., 2001; Sekine et al., 2003). Du fait de leur implication dans diverses fonctions cognitives, l'atteinte de ces régions serait à l'origine des symptômes psychiatriques et des déficits cognitifs décelés chez les consommateurs de METH. Plusieurs études ont passé au crible un grand nombre de fonctions cognitives régulées par ces régions. C'est ainsi que les études cliniques ont rapporté une altération du niveau d'apprentissage verbal (Volkow et al., 2001a-a), des fonctions exécutives (Johanson et al., 2006), des déficits mnésiques (Volkow et al., 2001b ; Chang et al., 2002), ainsi qu'un déficit attentionnel (Chang et al., 2002 ; Johanson et al., 2006) et une diminution de la vitesse de traitement de l'information chez les consommateurs de METH (Scott et al., 2007). En outre, d'autres études se sont intéressées aux comorbidités psychiatriques observées dans la dépendance à la METH. La consommation de METH est associée à un grand nombre d'hospitalisations psychiatriques pour paranoïa (45% des consommateurs de METH disent avoir eu des hallucinations et des états paranoïaques suite à l'usage de la METH), anxiété (observée chez 50% d'utilisateurs de METH) et syndrome dépressif (la prévalence des troubles de l'humeur chez des sujets dépendants aux amphétamines est de 64%) (Scott et al., 2007; Salo et al., 2011) associés à

une modification de fonctionnement des régions limbiques et paralimbiques (London et al., 2004).

ii. Atteintes neurologiques chez les primates non humains

Les études réalisées chez le singe ont montré que l'administration de doses croissantes de METH induit une diminution des taux de DA dans le striatum, accompagnée d'une perte des DAT (Preston et al., 1985a; Melega et al., 2008). Une diminution des concentrations de sérotonine dans le striatum, le cortex et l'hippocampe de ces animaux a également été observée (Preston et al., 1985b). Plus récemment, l'utilisation de l'imagerie cérébrale a permis d'observer une diminution du taux de DA, ainsi que du nombre de DAT dans le striatum de singes ayant reçu la METH (Melega et al., 2000). Par contre, les corps cellulaires dopaminergiques situés dans la SN n'ont pas été affectés par le traitement à la METH (Melega et al., 1997). En accord avec ce qui a été observé chez l'Homme, les pertes dopaminergiques induites par la METH persistent 4 ans après l'administration de fortes doses de la drogue (Woolverton et al., 1989).

iii. Atteintes neurologiques chez les rongeurs

Chez les rongeurs, deux protocoles permettent de modéliser les effets neurotoxiques de la METH observés chez l'homme: soit une injection aigue de METH à forte dose (30-40 mg/kg), soit 4 injections de 10mg/kg chacune, séparées par un intervalle de 2h (pour revue : (Davidson et al., 2001)). Après administration de METH selon ces protocoles, une diminution des différents marqueurs dopaminergiques a été observée. En effet, la METH induit une diminution à long terme des concentrations striatales de DA et de ses métabolites, l'acide dihydroxyphénylacétique et l'acide homovanillique (Kita et al., 1996), ainsi qu'une diminution d'expression de la TH (Ricaurte et al., 1982). La METH induit également des effets à long terme sur les DAT et VMAT-2 avec une altération de leur fonction (Fleckenstein et al., 1997; Brown et al., 2000), ainsi qu'une diminution du nombre des DAT (Wagner et al., 1980; O'Callaghan and Miller, 1994). En plus de la perte des terminaisons neuronales, les études réalisées chez les rongeurs ont permis de mettre en évidence une mort des neurones dans le striatum et le cortex (Zhu et al., 2006 ; Deng et al., 2007). Cette mort cellulaire

résulte de processus apoptotiques puisque la METH (1) régule l'expression de plusieurs gènes pro et anti-apoptotiques (Jayanthi et al., 2001; Imam et al., 2001a), (2) active les caspases, des enzymes spécifiques de l'apoptose cellulaire (Deng et al., 2002; Jayanthi et al., 2004) et (3) induit une fragmentation de l'ADN (Cadet et al., 2002).

2. Mécanismes de toxicité induits par la METH

De nombreuses études ont permis de mettre en évidence que la METH déclenche plusieurs évènements cellulaires et moléculaires qui aboutissent à la dégénérescence des terminaisons nerveuses ainsi qu'à l'apoptose neuronale observées suite à l'administration chronique de ce psychostimulant. Je décrirai d'abord l'implication du stress oxydatif dans la toxicité induite par la METH, en détaillant le rôle que jouent (1) l'excitotoxicité glutamatergique, (2) les mitochondries et (3) les réticulums endoplasmiques dans ce phénomène de toxicité. J'exposerai ensuite l'implication de l'hyperthermie induite par la METH dans l'exacerbation de la toxicité de cette dernière. Enfin, je décrirai l'implication de l'activation microgliale dans la neurotoxicité induite par la METH.

i. METH et stress oxydatif

L'administration de METH induit un stress oxydatif en créant un déséquilibre entre la production d'espèces oxygénées réactives (reactive oxygen species, ROS) et la capacité de détoxification du système enzymatique (Tata et al., 2007 ; Krasnova and Cadet, 2009). Cette idée a été confortée par le fait que l'administration d'antioxydants, d'inhibiteurs de peroxydation des lipides, ainsi que l'inactivation des radicaux libres permet de diminuer la toxicité striatale induite par la METH (Fukami et al., 2004; Thrash et al., 2009). Des études réalisées sur des souris transgéniques surexprimant l'enzyme antioxydante CuZnSOD (antioxydant enzyme copper/zinc SuperOxyde Dismutase) ont également montré une protection des terminaisons nerveuses striatales (Cadet et al., 1994; Krasnova and Cadet, 2009).

a- Implication de la DA

L'implication de la DA endogène dans le phénomène de neurotoxicité induite par la METH a été démontrée dans plusieurs études. L'inhibition de la TH à l'aide de la α-methyl-p-tyrosine protège contre les lésions induites par la METH au niveau des terminaisons dopaminergiques striatales (Schmidt et al., 1985 ; Thomas et al., 2008), tandis que l'administration de L-DOPA, précurseur direct de la DA, ou de la clorgyline, inhibiteur de la monoamine oxydase, augmente la toxicité induite par la METH (Krasnova and Cadet, 2009). De même, la diminution de la libération de DA par blocage des DATs protège contre la toxicité induite par la METH (Schmidt et al., 1985 ; Marek et al., 1990).

La METH induit une augmentation excessive de la concentration intracellulaire de DA. L'excès de DA est dégradé par les monoamines oxydases en DA quinones (Cadet and Brannock, 1998; LaVoie and Hastings, 1999; Quinton and Yamamoto, 2006; Kita et al., 2009) et libère des radicaux hydroxyl conduisant à l'accumulation de ROS comme le peroxyde d'hydrogène et les ions superoxydes (Gluck et al., 2001; Krasnova and Cadet, 2009; Thrash et al., 2009) (Figure 13). Ces composés interagissent ensemble et induisent des lésions des composants cellulaires, tels que les lipides, les protéines, l'ADN mitochondrial et l'ADN moléculaire (Fumagalli et al., 1998; Tata et al., 2007; Krasnova and Cadet, 2009; Thrash et al., 2009), à l'origine de l'apoptose cellulaire et de la dégénérescence des terminaisons neuronales induites par la METH.

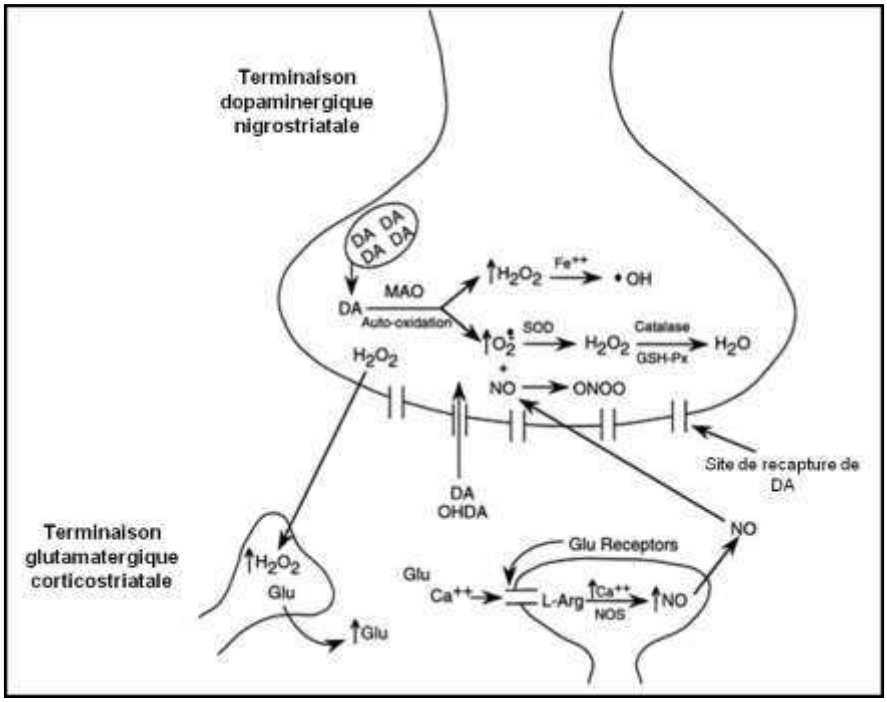


Figure 13. Mécanismes d'interaction dopamine-glutamate impliqués dans la dégénérescence du système dopaminergique nigrostriatale. *(Cadet et Brannock 1998)*

b- Excitotoxicité

Des études expérimentales ont montré que l'administration de METH induit une augmentation de la concentration extracellulaire de glutamate dans le striatum et l'hippocampe (Nash and Yamamoto, 1992; Mark et al., 2004; Quinton and Yamamoto, 2006) via une boucle de rétrocontrôle striatothalamocorticale (Mark et al., 2004) (Figure 8). De plus, l'administration d'antagonistes des récepteurs glutamatergiques diminue la dégénérescence dopaminergique induite par la METH dans différentes régions cérébrales dont le striatum (Sonsalla et al., 1989; Battaglia et al., 2002; Chipana et al., 2008). Ces données permettent donc de proposer une participation de l'excitotoxicité à la neurotoxicité de la METH.

Le glutamate est le neurotransmetteur excitateur le plus abondant dans le système nerveux central chez les vertébrés. Il agit en s'associant aux récepteurs ionotropiques NMDA et AMPA et à des récepteurs métabotropiques (couplés à une protéine G) (*pour revue* (Beal, 1992)). L'excitotoxicité est un phénomène d'altération, voire de destruction neuronale, qui

survient suite à une altération prolongée ou excessive des récepteurs excitateurs neuronaux comme les récepteurs AMPA et NMDA par des acides aminés excitateurs tel le glutamate. Cette hyperactivation induit une entrée massive de Ca^{2+} dans la cellule, activant de nombreuses enzymes comme des kinases, des lipases et des protéases pouvant induire la déstructuration du cytosquelette et donc fragiliser la viabilité de la cellule (Sattler and Tymianski, 2000; Thrash et al., 2009).

Par ailleurs, un autre mécanisme impliqué dans l'excitotoxicité est la formation d'un second messager particulier suite à l'activation des récepteurs NMDA : le monoxyde d'azote (nitric oxyde NO), qui est un produit toxique impliqué dans la toxicité neuronale induite par le glutamate dans des neurones striataux et corticaux en culture (Dawson et al., 1991) (Figure 14). Le NO peut, par augmentation de l'activité de la NO synthase (NOS) induite par l'augmentation de concentration intracellulaire de Ca^{2+}, interagir avec l'ion superoxyde (O^{2-}) pour former le peroxynitrite ($ONOO^{-}$), un oxydant puissant. Suite à l'administration de METH, une augmentation de l'expression d'un marqueur de la production de peroxynitrite, la 3-nitrotyrosine (3-NT), a été observée *in vitro* et *in vivo* (Imam et al., 2001b). L'invalidation génétique et pharmacologique de la nNOS (NOS neuronale) protège contre la toxicité induite par la METH (Cadet et al., 1994; Itzhak and Ali, 1996; Imam et al., 2001a; Imam et al., 2001b).

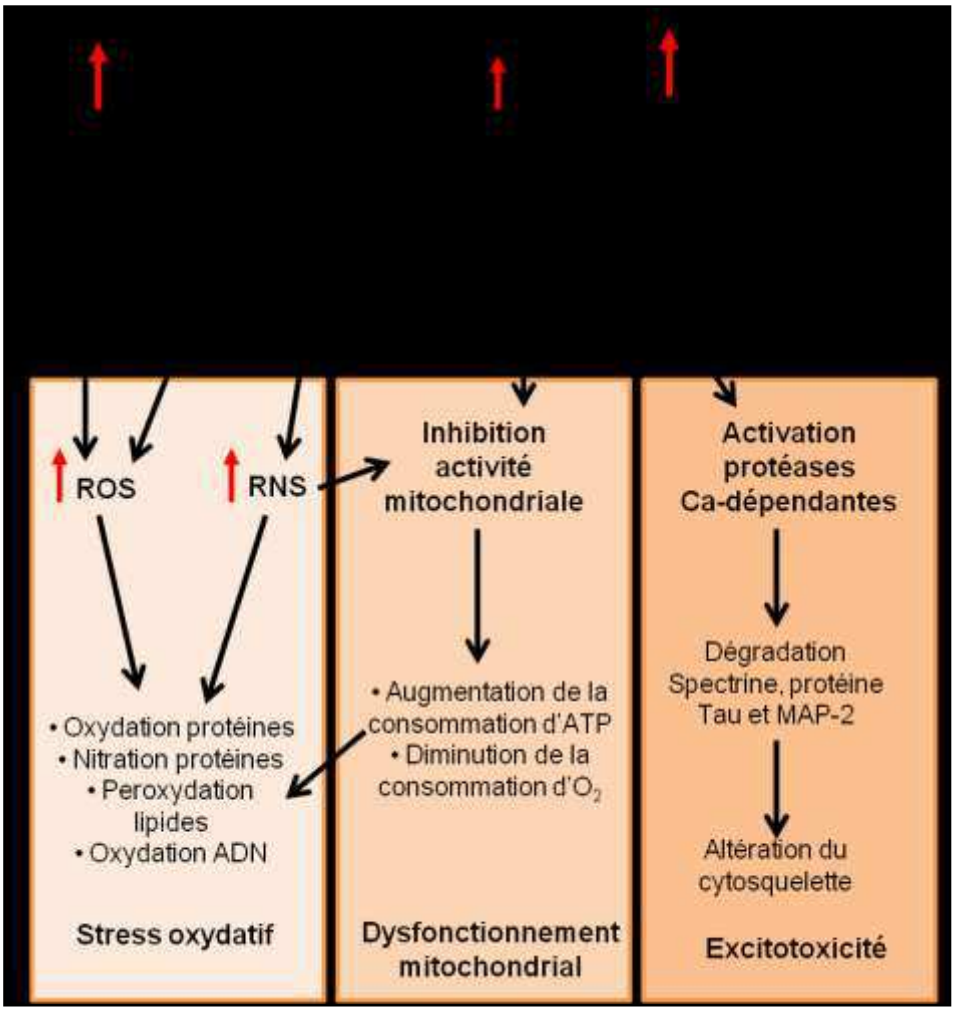


Figure 14. Schéma représentatif des causes et conséquences de la neurotoxicité induite par la METH.

L'augmentation de la concentration extracellulaire de dopamine (DA) induite par la METH génère de la DA quinone, des radicaux hydroxyles (•OH) et des espèces oxygénées réactives (ROS). De plus, une augmentation de la libération de Glutamate induite par la METH provoque l'augmentation des concentrations intracellulaires de Calcium. Il y a alors activation de la NOS, enzyme de synthèse du monoxyde d'azote (NO) et, par conséquent, génération d'espèces nitrées réactives (RNS). Les ROS et RNS induisent des modifications des protéines, des lipides et de l'ADN, ainsi qu'un dysfonctionnement mitochondrial. L'augmentation de la concentration du calcium intracellulaire peut aussi inhiber directement le fonctionnement mitochondrial. De même, il y a activation des protéases calcium-dépendantes qui déclenchent la protéolyse de protéines du cytosquelette. *(modifiée d'après Quinton et Yamamoto, 2006)*

c- Implication des mitochondries

Un autre mécanisme impliqué dans la toxicité induite par la METH fait intervenir les chaînes d'oxydoréduction mitochondriales. En effet, la METH provoque une réduction de la production énergétique et une diminution du stock striatal d'ATP (Chan et al., 1994). A l'inverse, une augmentation de la production d'ATP, induite par perfusion intra-striatale de l'ubiquinone (composant de la chaîne de transport d'électrons) ou de la nicotinamide (précurseur de la coenzyme NAD responsable du transfert d'électrons), semble diminuer la toxicité dopaminergique induite par la METH dans cette même structure (Stephans et al., 1998). Par ailleurs, une administration systémique de METH induit une diminution de l'activité du cytochrome oxydase, ou du complexe IV, et du complexe II, reflétant une altération de l'activité de la chaîne mitochondriale dans des structures pour lesquelles la METH est neurotoxique comme le striatum et la SN (Chan et al., 1994; Burrows et al., 2000; Brown et al., 2005). En outre, la METH est une molécule lipophile chargée positivement, capable de diffuser à travers la membrane mitochondriale (Krasnova and Cadet, 2009). L'accumulation de METH dans la mitochondrie altère le gradient électrochimique, établi grâce à la chaîne de phosphorylation, inhibe la chaîne de transport d'électrons, et perturbe le fonctionnement de l'ATP synthase, menaçant ainsi la survie de la cellule (Davidson et al., 2001; Riddle et al., 2006).

Par ailleurs, tous les mécanismes de toxicité déclenchés par la METH peuvent interagir entre eux pour potentialiser son effet toxique. Ainsi, le système glutamatergique est impliqué dans le dysfonctionnement mitochondrial qui a lieu, puisqu'un prétraitement avec des antagonistes des récepteurs NMDA, comme le MK801, prévient la diminution de l'activité du complexe II mitochondrial induite par l'administration de METH (Brown et al., 2005; Riddle et al., 2006). De son côté, la diminution de l'activité du complexe IV mitochondrial semble passer par la production de NO qui, en retour, inhibe ce complexe (Burrows et al., 2000) et potentialise le stress oxydatif induit par la METH (Krasnova and Cadet, 2009). Aussi, suite au déficit énergétique résultant du dysfonctionnement mitochondrial, la pompe Na^+/K^+ ATPase n'est plus fonctionnelle et donc le Ca^{2+} ne peut plus être stocké dans les mitochondries (*pour revue* : (Davidson et al., 2001; Krasnova and Cadet,

2009)). Il y a alors diminution du potentiel membranaire de la mitochondrie de manière proportionnelle à la concentration de Ca^{2+} stocké (Beal, 1992). Dans le cas de la METH, son administration induit une augmentation excessive des concentrations intracellulaires de Ca^{2+}, ne pouvant pas être pris en charge par les mitochondries à cause du dysfonctionnement mitochondrial induit par la METH elle-même. Ainsi a lieu une perméabilisation de la membrane externe des mitochondries par modification du potentiel membranaire et initiation d'un phénomène d'apoptose Ca^{2+}-dépendante.

La modification du potentiel membranaire induit par la METH, au niveau des mitochondries, provoque l'ouverture des pores de transition de perméabilité, situés au niveau de la membrane mitochondriale, libérant ainsi, dans le cytosol, des molécules pro-apoptotiques telles que les cytochromes c, les caspases 2, 3 et 9, ainsi que le facteur apoptotique AIF (Apoptosis Inducing Factor) impliqué dans l'apoptose nucléaire (Krasnova and Cadet, 2009). La libération de ces facteurs est suivie de la destruction de différentes protéines de structure dont PARP (poly-ADP ribose polymérase) et les lamines (Jayanthi et al., 2004), ainsi que de la déstructuration du cytosquelette (Quinton and Yamamoto, 2006; Krasnova and Cadet, 2009).

En plus de la perte des terminaisons neuronales, la METH déclenche la mort des neurones dans le striatum et le cortex (Cadet et al., 1997 ; Zhu et al., 2006 ; Cadet et al., 2007 ; Deng et al., 2007). Plusieurs études ont permis de montrer que cette mort cellulaire impliquerait des mécanismes apoptotiques. En effet, l'administration de METH : (1) régule l'expression de gènes pro- et anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 (Jayanthi et al., 2001; Imam et al., 2001a; Cadet et al., 2007; Krasnova and Cadet, 2009), (2) augmente la libération de protéines mitochondriales pro-apoptotiques (Deng et al., 2002) et (3) augmente l'activité du facteur de transcription AP-1 (Sheng et al., 1996; Flora et al., 2002). D'un autre côté, la surexpression de Bcl-2 (Cadet et al., 1997) et l'inhibition des caspases (Krasnova and Cadet, 2009) protègent contre les effets apoptotiques induits par la METH (Cadet et al., 1997). De plus, des souris KO pour la p53, une protéine pro-apoptotique dont l'expression est augmentée par la METH, sont protégées contre les effets apoptotiques de la drogue (Hirata and Cadet, 1997).

d- Implication du réticulum endoplasmique

La neurotoxicité induite par la METH ne dépend pas uniquement des mitochondries, en particulier pour ce qui concerne la mort neuronale. L'administration de doses toxiques de METH augmente l'expression de certaines protéines qui participent au phénomène d'apoptose induite par le réticulum endoplasmique. Parmi ces protéines, on trouve notamment la calpaïne (Jayanthi et al., 2004). Le stress induit par le réticulum endoplasmique et le déséquilibre de l'homéostasie calcique semblent participer à la toxicité induite par la METH via l'activation de la calpaïne. Cette protéase est une enzyme cytosolique Ca^{2+}-dépendante, impliquée dans la protéolyse de la spectrine, et dans le clivage de protéines du cytosquelette dans le cortex, le striatum et l'hippocampe de rats (Quinton and Yamamoto, 2006). En travaillant sur cette protéase, dans le cadre d'un modèle animal de la maladie de Parkinson, Samantaray et collaborateurs ont trouvé qu'une augmentation de l'activité de la calpaïne initie l'apoptose de neurones corticaux ainsi que celle de motoneurones spinaux, alors que son inhibition provoquerait une diminution de la perte neuronale induite par la METH (Samantaray et al., 2006).

ii. METH et Hyperthermie

L'impact de la température ambiante sur le stress oxydatif évalué dans d'autres modèles expérimentaux a poussé les chercheurs à s'intéresser aux mécanismes par lesquels l'hyperthermie corporelle induite par la METH (Fleckenstein et al., 1997; Krasnova and Cadet, 2009) participerait à la toxicité de la drogue. Dans des conditions d'induction de l'hypothermie ou de prévention de l'hyperthermie, plusieurs études ont rapporté une protection, plutôt partielle, contre la toxicité induite par la METH (Bowyer et al., 1994; Albers and Sonsalla, 1995; Ali et al., 1996; Tata et al., 2007). Bowyer et collaborateurs ont démontré qu'une même dose de METH est moins toxique quand elle est injectée dans un environnement à 4°C que lorsqu'elle est injectée dans un environnement à 22°C (Bowyer et al., 1993; Bowyer et al., 1994). Aussi, la prévention de l'hyperthermie par utilisation d'agents hypothermiques comme le MK801, antagoniste des récepteurs NMDA, protège contre la

toxicité induite par la METH (Miller et O'Callaghan, 1994 ; Albers and Sonsalla, 1995 ; Ali et al., 1996).

Par ailleurs, Bowyer et collaborateurs ont montré que l'hyperthermie induite par la METH est associée à une perte des terminaisons striatales, alors que l'hyperthermie seule ne produit pas de dégénérescence (Bowyer et al., 1994). De la même façon, des manipulations pharmacologiques et génétiques peuvent bloquer la toxicité induite par la METH sans pour autant influencer la réponse thermique ; c'est le cas du neuropeptide Y (NPY) (Thiriet et al., 2005), des souris KO pour l'interleukin-6 (Ladenheim et al., 2000) et de la délétion de l'enzyme Jun kinase (Deng et al., 2002). L'hyperthermie contribuerait donc en partie à la neurotoxicité induite par la METH. Cette idée est confortée par les résultats de LaVoie et Hastings qui ont démontré que la METH, administrée à basse température, ne diminuait pas l'efflux de DA mais empêchait son oxydation (LaVoie and Hastings, 1999). En effet, il existerait une relation entre l'augmentation de la température corporelle et la formation de radicaux libres puisque la prévention de l'hyperthermie induite par une injection de METH bloquerait l'augmentation du taux de 2,3-DHBA, un marqueur de la formation de ROS (Fleckenstein et al., 1997). Aussi, l'hyperthermie augmente significativement la formation de DA quinones (LaVoie and Hastings, 1999), qui modifient l'activité des DAT, inactivent la TH (Kuhn et al., 1999) et induisent la perte des neurones DA (Zafar et al., 2006).

De plus, l'implication du système dopaminergique dans le phénomène d'hyperthermie induite par la METH a été étudiée. Il semblerait que les DAT et les récepteurs dopaminergiques y participent. En effet, des souris KO pour le DAT ne présentent pas d'hyperthermie suite à un traitement à la METH, suggérant que la METH pourrait exercer ses effets hyperthermiques via son action au niveau des DATs (Numachi et al., 2007). Aussi, des études ont montré que l'activation des récepteurs dopaminergiques D1 et D2 est nécessaire pour la mise en place du phénomène d'hyperthermie en réponse à la METH puisque l'administration d'agonistes D1 (ex. SKF38393) induit une hyperthermie, tandis que l'administration d'antagonistes D1 (ex. SCH23390) la bloque (Sanchez, 1989).

iii. Autre mécanisme impliqué dans la neurotoxicité : Activation gliale

Dans un cerveau mature physiologiquement normal, les microglies, principales cellules immunitaires du SNC, sont au repos et présentent une forme ramifiée caractéristique de leur état quiescent (Block et al., 2007). En réponse à certains facteurs stressants comme une lésion cérébrale ou une inflammation, les microglies ont la capacité de subir rapidement des changements morphologiques, fonctionnels et immunophénotypiques passant ainsi d'un état inactif à un état actif. On parle alors d'activation microgliale (pour revue : (Block et al., 2007)). Les microglies activées sont impliquées dans différentes fonctions physiologiques permettant la régulation du développement cérébral : (1) elles augmentent la probabilité de survie neuronale par libération de facteurs trophiques et anti-inflammatoires (Liao et al., 2005), (2) elles déclenchent la phagocytose des cellules mortes (Block et al., 2007), et (3) elles orchestrent la réaction inflammatoire par libération de molécules pro-inflammatoires et pro-apoptotiques (ex. cytokines et chemokines), des espèces réactives oxygénées et azotées (Colton and Gilbert, 1987 ; Liu and Hong, 2003 ; Block et al., 2007).

Cette activation microgliale est à double tranchant puisqu'une activation aigue permet de protéger et de guérir le tissu neuronal tandis qu'une activation chronique provoque des effets neurotoxiques. Dans le cas de la METH, de nombreuses études ont montré une augmentation de l'activation microgliale aussi bien chez les rongeurs (Bowyer et al., 1994 ; Escubedo et al., 1998 ; Guilarte et al., 2003 ; LaVoie et al., 2004) que chez l'Homme (Sekine et al., 2008), et ce dans plusieurs régions cérébrales (Sekine et al., 2001 ; Sekine et al., 2003 ; London et al., 2004). L'étude de Ladenheim et collaborateurs, montrant une atténuation de la neurotoxicité induite par la METH chez des souris KO pour l'interleukine-6 (Ladenheim et al., 2000), permet de soutenir l'idée de l'implication de l'activation microgliale dans la neurotoxicité induite par la METH. De plus, des agents pharmacologiques potentialisant les effets toxiques de la METH augmentent l'activation microgliale induite par cette drogue dans le striatum (Thomas et al., 2008), alors que des agents protecteurs contre la toxicité du psychostimulant, comme le MK-801, permettent de

bloquer cette activation microgliale (Thomas and Kuhn, 2005; Thomas et al., 2008). De surcroit, l'administration de molécules anti-inflammatoires protège contre la neurotoxicité et l'activation microgliale induites par la METH (Zhang et al., 2006).

Comme le blocage de l'activation microgliale ne permet pas une protection totale contre la toxicité induite par la METH (Sriram et al., 2006a), des études ont été réalisées afin d'élucider le rôle des microglies dans la dégénérescence neuronale induite par ce psychostimulant. Les microglies pourraient potentialiser les effets toxiques de la METH par libération de substances toxiques pour les neurones. Ainsi, un traitement à la METH augmente la libération de cytokines proinflammatoires, comme les interleukines IL-1β et IL-6 (Flora et al., 2002; Sriram et al., 2006b; Goncalves et al., 2008), qui contribuent aux effets toxiques du psychostimulant. Aussi, les microglies aggravent la toxicité induite par la METH par libération de radicaux superoxydes et du NO (Block et al., 2007) impliqués dans la neurotoxicité induite par la METH (Figure 15). Afin d'expliquer l'activation gliale observée suite à un traitement à la METH, Kuhn et collaborateurs ont étudié l'effet de l'oxydation de DA sur l'activité des microglies. Ils ont trouvé que la DA quinone, produit résultant de l'autooxidation de la DA, est capable de réguler l'expression des gènes microgliaux : elle augmente l'expression de gènes associés à des conditions neurotoxiques comme ceux impliqués dans les processus inflammatoires (cytokines, chemokines et prostaglandines) et diminue l'expression de gènes codant pour des récepteurs impliqués dans les mécanismes de protection assurés par les microglies (ex. Sestrin1 qui intervient dans la fonction anti-oxydante des microglies) (Kuhn et al., 2006). Ainsi, l'activation microgliale est le résultat de la neurotoxicité induite par la METH et, en même temps, contribue à potentialiser cette toxicité.

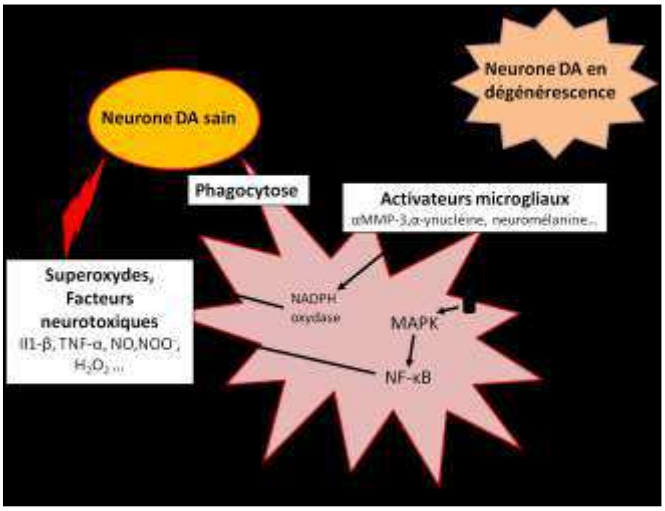


Figure 15. L'activation microgliale induite par la METH.

La dégénérescence des neurones dopaminergiques induite par différents stimuli résulte en une activation microgliale via des facteurs de signalisation comme la α-synucléine, la αMPP3 et la neuromélanine. Il y a activation des cascades intracellulaires comme la voie des MAPK et la NADPH oxydase. Les microglies vont alors libérer des cytokines inflammatoires, du NO, des produits superoxydes, qui participent à la dégénérescence des neurones dopaminergiques. *(d'après Kim et Joh, 2006)*

Chapitre 2 – Impact des facteurs environnementaux sur les effets des drogues

Comme vu dans le chapitre précédent, les individus n'ont pas le même niveau de vulnérabilité face aux drogues d'abus. Un facteur primordial dans la détermination de cette vulnérabilité est l'« environnement ». Ce terme regroupe des facteurs tels que les conditions socio-économiques, les relations sociales et les expériences de vie. Dans notre équipe de recherche, nous nous intéressons de près à l'impact des facteurs environnementaux positifs (environnement enrichi (EE)) et négatifs (facteurs de stress) sur la prise de drogue chez les rongeurs. Ce chapitre est divisé en deux parties. Dans la première, je présenterai l'influence des deux facteurs, l'EE et le stress, sur la dépendance aux drogues d'abus. La deuxième partie traitera de la modulation, par ces facteurs environnementaux, de la toxicité induite par certaines drogues d'abus, en particulier les amphétamines.

A- Impact environnemental sur la dépendance aux drogues d'abus

3. Exposition à divers stress et consommation de drogues

Des études réalisées chez l'Homme et chez l'animal indiquent que la vulnérabilité aux drogues d'abus est accrue par l'exposition à des évènements stressants. En effet, les facteurs de stress peuvent déclencher, intensifier, prolonger la consommation de drogues, ainsi que provoquer un phénomène de rechute même après des périodes de sevrage plus ou moins longues (pour revue ((Sinha, 2001)).

i. Le stress

a- Qu'est ce que le stress ?

Le « stress » est un terme général, à connotation négative, qui désigne l'ensemble des réponses d'un organisme quand il est soumis à des contraintes, internes ou

environnementales, qui peuvent compromettre son homéostasie et sa survie. Ces contraintes peuvent être physiques, physiologiques, infectieuses, chimiques, environnementales ou psycho-émotionnelles, et induisent des réponses physiologiques, psychosomatiques et comportementales. Le terme « stress » crée une certaine ambiguïté puisqu'un stress n'est pas toujours négatif. En effet, certains types de stress tels que les échéances réalistes et les changements voulus, constituent un stress bénéfique et induisent des réactions adaptatives, biologiques et psychologiques, nécessaires à l'augmentation de la motivation et de la performance. C'est ce qu'on appelle « eustress ». A l'inverse, un stress est négatif quand il est constitué de situations menaçantes, ou perçues comme contraignantes, durant une période plus ou moins longue, et induisant une diminution des performances et un épuisement de l'organisme. On parle alors de « détresse ». La notion de « stress » a été introduite en biologie par l'endocrinologue Hans Selye, qui fut le premier à décrire le mécanisme du « syndrome général d'adaptation » regroupant l'ensemble des réponses qui permettent à un organisme de faire face à un évènement stressant (Selye, 1950). Ce syndrome suit trois stades successifs :

(1) *La réaction d'alarme* : l'apparition de l'agent stressant déclenche des réponses archaïques dont le but principal est la conservation de l'organisme. Il y a ainsi activation du système nerveux sympathique et des glandes médullosurrénales libérant la noradrénaline et l'adrénaline. Ces hormones vont stimuler les organes nécessaires à la survie tels que le cœur, les muscles striés, le foie et les poumons, et inhiber d'autres, moins importants dans une situation de possible danger, tels que les systèmes digestif et uro-génital.

(2) *Le stade de résistance* : cette réaction se met en place un peu plus tard et dure plus longtemps que la réaction d'alarme. Elle fait intervenir principalement l'axe HPA *(cf. Chapitre 1)*. Les glucocorticoïdes libérés suite à l'activation de l'axe HPA ont la capacité de mobiliser et rediriger la production d'énergie vers le cerveau et le système cardio-vasculaire, de stimuler la fonction immunitaire, d'inhiber la fonction reproductive et l'appétit, et d'augmenter les fonctions cognitives (attention et prise de décision) et émotionnelles (anxiété) nécessaires pour faire face à l'agent stressant (pour revue (Sapolsky et al., 2000)).

(3) *La phase d'épuisement* : quand la situation stressante perdure ou se répète les ressources énergétiques de l'organisme s'épuisent et ses capacités cognitives se réduisent. La stimulation soutenue des processus physiologiques, et plus particulièrement de l'axe HPA, induit des effets néfastes tels que l'affaiblissement du système immunitaire et la diminution de la plasticité cérébrale.

b- Observations chez l'Homme

Chez l'Homme, de nombreuses études épidémiologiques ont permis de mettre en évidence une corrélation positive entre les conditions de vie stressantes et l'augmentation de la prise de drogues (pour revue : (Jacobsen et al., 2001; Sinha, 2001)). Dans certains cas, ces expériences négatives peuvent s'étaler sur toutes les périodes de la vie, depuis l'adolescence jusqu'à l'âge adulte. Par exemple, il semblerait que des individus ayant subi des abus physiques et sexuels à un âge précoce soient plus susceptibles de consommer de la drogue que des sujets sans historique de violences (Dembo et al., 1988; Harrison et al., 1997). De même, des études réalisées auprès d'adolescents montrent que des niveaux de stress élevés induits par l'absence de soutien parental prédisent une plus forte consommation de cannabis, d'alcool et de nicotine chez ces personnes (Newcomb and Bentler, 1988; Wills et al., 1996). Dans d'autres cas, le facteur stressant est plus ponctuel. Ainsi, chez des patients souffrant du syndrome de stress post-traumatique, l'usage de certaines substances addictives, comme l'alcool, le cannabis et les benzodiazépines, semble constituer une forme d'automédication : les patients consomment ces substances pour améliorer les symptômes associés à leur maladie et se sentir mieux (Bremner et al., 1996). De plus, dans une étude réalisée en laboratoire, Sinha et al ont démontré que, chez des consommateurs de cocaïne, l'exposition à un stress psychologique aigu augmentait le sentiment de « craving » c'est à dire l'envie de consommer une drogue pour ressentir les effets qu'elle induit (Sinha et al., 1999). De nombreuses études cliniques réalisées auprès de personnes dépendantes aux drogues d'abus et à l'alcool présentent le stress et les émotions négatives comme étant des facteurs induisant la rechute (pour revue : (Sinha, 2001; Goeders, 2002; Marinelli and Piazza, 2002)) notamment à la cocaïne (McKay et al., 1995).

c- Etudes réalisées chez l'animal

Divers modèles animaux ont été développés afin d'étudier l'impact des expériences négatives sur la vulnérabilité à développer une dépendance ou à rechuter. Différents types de stress ont été utilisés pour modéliser ces expériences négatives de façon pré- et post-natales, sur la vulnérabilité à l'addiction. Il a par exemple été montré, d'une part, qu'un stress prénatal augmentait la probabilité de développer une addiction aux amphétamines à l'âge adulte : ceci a été observé chez des rats adultes dont les mères avaient été soumises à une procédure de contention pendant la dernière semaine de gestation (Deminiere et al., 1992). D'autre part, et comme présenté dans le chapitre précédent, une exposition aux drogues lors de la période postnatale est associée à la mise en place de comportements anxieux et dépressifs chez le rongeur adulte (Overstreet et al., 2000) *(cf. Chapitre 1)*. Chez les rongeurs, une séparation sociale à un âge précoce est capable de modifier la réactivité de l'animal à une drogue. Ainsi, des manipulations expérimentales ont montré que, comparés à des rats élevés en groupe, les rats isolés, depuis le sevrage et jusqu'à l'âge adulte, sont plus sensibles aux effets stimulants de la cocaïne (ils présentent une réponse motrice plus importante que ceux élevés en groupe), mais ont plus de mal à acquérir le comportement d'auto-administration de cette drogue (Phillips et al., 1994). En outre, plusieurs études ont montré qu'un stress comportemental aigu, tel qu'un choc électrique, facilitait l'acquisition de l'auto-administration de psychostimulants comme la cocaïne (Ramsey and Van Ree, 1993; Goeders and Guerin, 1994). De plus, le modèle de préférence de place conditionnée a permis de mettre en évidence le rôle du stress dans l'intensification des effets récompensants de la cocaïne. Ainsi, des souris ayant subi des séances de nage forcée de façon répétée (McLaughlin et al., 2003) ou le test de défaite sociale (McLaughlin et al., 2006) présentent une plus grande préférence de place pour le compartiment associé à la drogue en comparaison à des souris naïves.

Le rôle du stress ne se limite pas à l'acquisition et au maintien de l'addiction. Il constitue aussi un stimulus induisant une rechute. La rechute est l'une des principales caractéristiques de l'addiction aux drogues. Elle consiste en la réinstallation d'un comportement de recherche de drogue suite à une période de sevrage plus ou moins longue

(Epstein et al., 2006). Il a été montré que la rechute peut être induite par (1) l'exposition de l'individu à la drogue, (2) son exposition aux indices qui ont été préalablement associés à la drogue ou (3) son exposition à des facteurs stressants (Epstein et al, 2006). En effet, plusieurs études ont montré que l'application de chocs électriques à des rats en sevrage provoque la réinstallation du comportement de recherche de drogues, comme l'héroïne (Shaham and Stewart, 1995) ou la cocaïne (Erb et al., 1996; Mantsch and Goeders, 1999). Cette rechute induite par le stress est aussi observée suite à un stress pharmacologique comme celui induit par l'administration de yohimbine, un modulateur de la fonction noradrénergique. Il a ainsi été montré que le stress induit par cette molécule produit une rechute à des drogues telles que la METH (Shepard et al., 2004) et la cocaïne (Lee et al., 2004; Chauvet et al., 2009).

ii. Interactions neurobiologiques entre facteurs de stress et addiction

Les circuits neuronaux qui sous-tendent la réponse au stress interagissent avec ceux qui promeuvent les effets récompensants des drogues. En effet, des études d'imagerie fonctionnelle indiquent que les facteurs de stress et l'exposition aux drogues activent les mêmes régions cérébrales appartenant aux systèmes dopaminergiques mésolimbiques et mésocortical (Kufahl et al., 2005; Sinha and Li, 2007). De même, des études précliniques ont montré qu'une exposition à un stress, aigu ou chronique, ainsi que l'administration de drogues induisent une augmentation de la libération de DA dans le système mésolimbique (Thierry et al., 1976 ; Kalivas and Duffy, 1989). La DA serait donc le substrat neurobiologique majeur à travers lequel le stress peut moduler les effets renforçants des drogues (Koob and Le Moal, 2001), ainsi que la motivation pour la recherche compulsive de drogues (Koob and Le Moal, 1997).

Le lien entre les expériences environnementales et le système mésocorticolimbique a été recherché. L'une des principales réponses biologiques engendrée par le stress est la libération de glucocorticoïdes par les glandes surrénales dans la circulation sanguine *(cf.*

Chapitre 1) (McEwen et al., 1986). En condition basale, peu de glucocorticoïdes et de DA sont libérés. La sensibilité aux drogues est donc réduite. Dans le cas d'un stress aigu, le taux de glucocorticoïdes libérés augmente. Il y a alors augmentation de la libération de DA dans le NAc (pour revue ((Piazza and Le Moal, 1998)). L'individu est plus sensible aux effets renforçateurs des drogues, ce qui pourrait induire une augmentation de la probabilité d'auto-administration de drogue. Cependant, les glucocorticoïdes activent un rétrocontrôle négatif via l'activation de leurs récepteurs hippocampiques, permettant le retour des deux systèmes à la normale (pour revue (Nestler et al., 2002)). Un stress répété induit une augmentation répétée du taux de glucocorticoïdes. Il y a alors dysfonctionnement du rétrocontrôle négatif (pour revue ((Nestler et al., 2002)). Il en résulte une augmentation de DA dans le NAc et donc une augmentation de la sensibilité de l'individu aux effets renforçants des drogues (pour revue (Piazza and Le Moal, 1998)) (Figure 16).

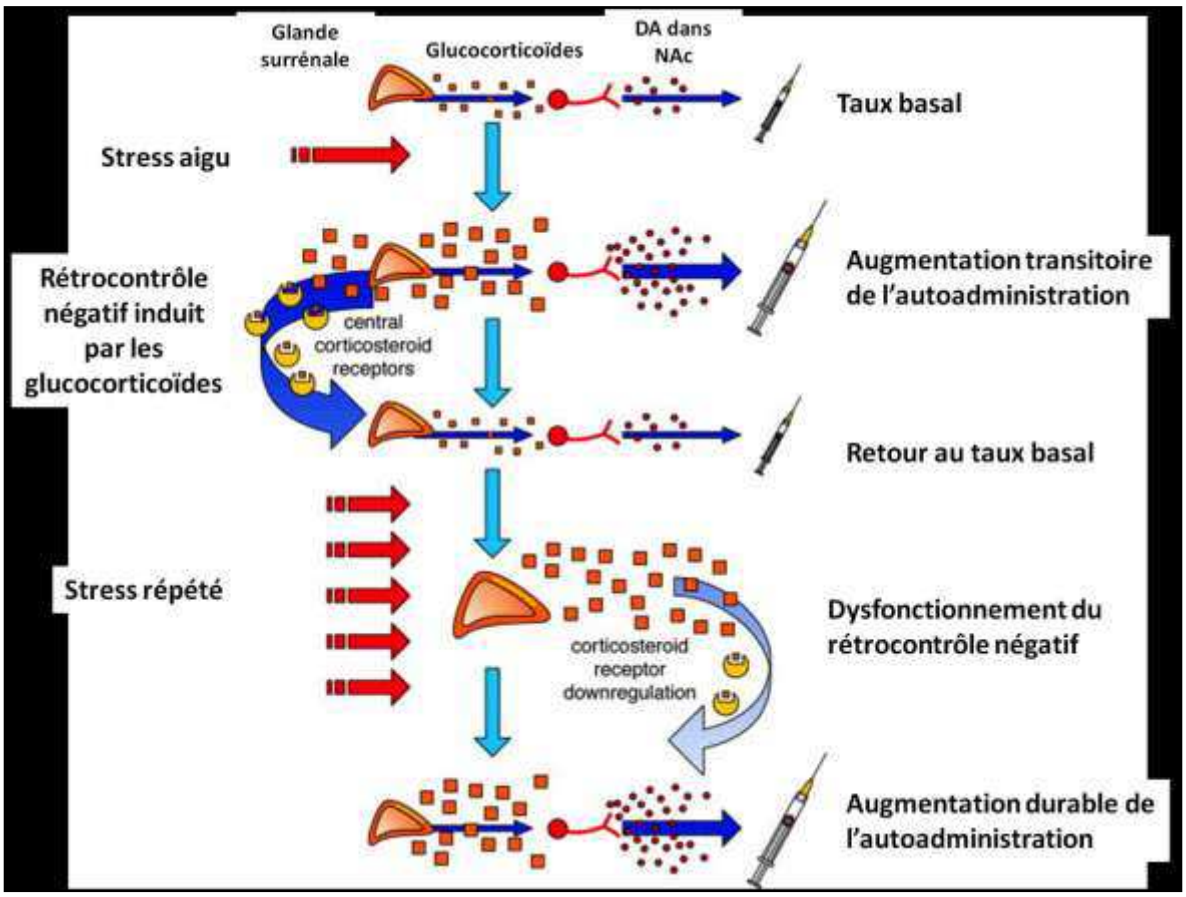


Figure 16. Représentation schématique de l'interaction neurobiologique entre stress et prise de drogues.
En orange, la libération de glucocorticoïdes par les glandes surrénales. En rouge, la libération de DA par le système mésolimbique. Ces deux systèmes interagissent en situation basale et pendant le stress. Ainsi, le taux de glucocorticoïdes détermine la quantité de DA qui sera libérée dans le NAc. *(D'après (Piazza et Le Moal, 1998))*.

Dans des conditions basales, l'administration périphérique de glucocorticoïdes à des rats induit une augmentation de la libération de DA dans le NAc (Piazza et al., 1996a) ainsi qu'une augmentation de la probabilité d'auto-administration d'amphétamine par ces animaux (Piazza et al., 1991). En revanche, une suppression de la sécrétion de glucocorticoïdes par ablation des glandes surrénales diminue la libération de DA dans le shell du NAc en réponse à la cocaïne (Piazza et al., 1996b). De plus, l'administration de corticostérone, le glucocorticoïde majoritaire produit chez le rat, à des rats facilite l'acquisition du comportement d'auto-administration de cocaïne (Mantsch et al., 1998). Par ailleurs, une augmentation de libération de corticostérone induite par le stress est associée à

une augmentation de l'auto-administration de psychostimulants comme la cocaïne et l'AMPH (Piazza and Le Moal, 1996; Mantsch et al., 1998) alors qu'un traitement avec un inhibiteur de synthèse ou de libération de corticostérone (Goeders, 2002) diminue la recherche et l'auto-administration de cocaïne. Enfin, il semblerait que la rechute induite par le stress fait intervenir le système CRF puisqu'en bloquant pharmacologiquement le récepteur CRF1, on bloque la rechute induite par un choc électrique aussi bien dans la recherche de cocaïne (Erb et al., 1998) que celle de l'héroïne (Shaham et al., 1997).

4. Impact des expériences positives sur la dépendance et modèle de l'environnement enrichi

Les expériences de vie négatives qu'expérimente le sujet sont souvent associées à une augmentation du risque d'addiction à l'adolescence et à l'âge adulte (De Bellis et al., 1999). A l'inverse, on peut donc supposer que l'exposition à des conditions de vie plutôt bénéfiques pourrait être à l'origine d'une certaine résistance et pourrait procurer des effets protecteurs contre l'abus de drogues et la dépendance. Dans les laboratoires de recherche préclinique, ces conditions de vie positives sont modélisées par l'exposition des animaux à un environnement dit environnement enrichi (EE) (pour revue (van Praag et al., 2000)).

i. L'environnement enrichi

a- Qu'est-ce qu'un Environnement Enrichi ?

L'EE est constitué d'« une combinaison de stimulations inanimées et sociales » (Rosenzweig et al., 1978). Comparé à un environnement standard (SE), l'EE est constitué d'une cage plus spacieuse contenant une roue ainsi que des jouets de taille, de forme et de couleurs différentes qui sont changés de manière régulière stimulant ainsi le comportement exploratoire et la curiosité de l'animal (Nithianantharajah and Hannan, 2006; Laviola et al., 2008) (Figure 17). La première utilisation du concept d'enrichissement environnemental remonte en 1947 quand Donald Hebb rapporte que des rats élevés en toute liberté dans sa propre maison ont un meilleur comportement d'exploration ainsi que de meilleures

capacités d'apprentissage que les rats vivant dans des cages de laboratoire (Hebb, 1947). Les modèles d'enrichissement utilisés sont nombreux et varient selon les laboratoires. Par exemple, certains utilisent l'EE comme environnement d'élevage (c'est le cas de notre équipe) tandis que d'autres n'exposent les animaux à l'EE que quelques heures par jour (Rampon et al., 2000a; Rampon et al., 2000b). Aussi, certaines études ont été faites avec pour contrôle des animaux élevés en groupe dans un SE (c'est le cas de notre équipe) tandis que d'autres utilisent des animaux isolés (Stairs and Bardo, 2009). Malgré la diversité des protocoles, il est clairement établi que l'exposition à l'EE présente une variété de conséquences positives aux niveaux neuroanatomique, biochimique et comportemental.

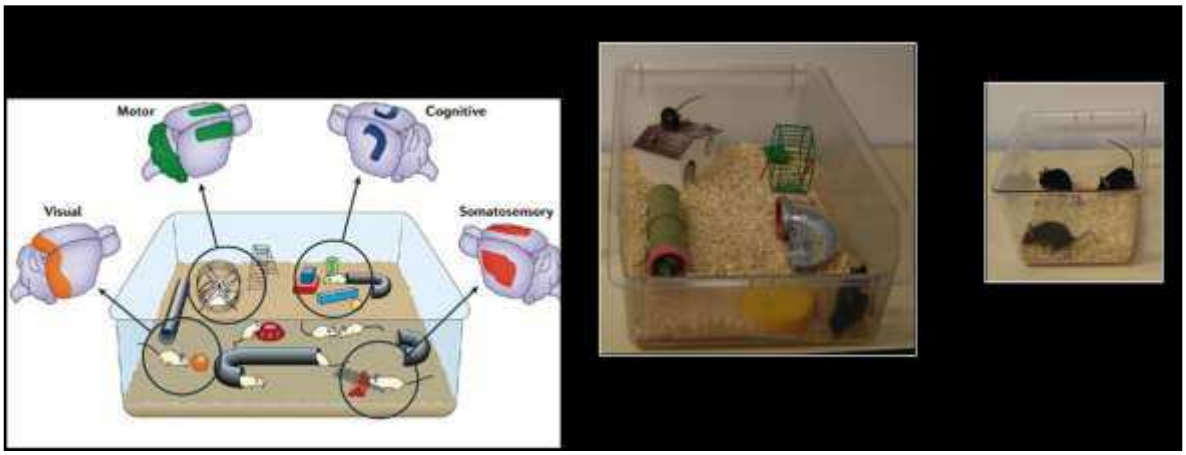


Figure 17. Illustrations de l'environnement enrichi.

a. L'environnement enrichi (EE) constitue un ensemble de stimulations visuelles, motrices, cognitives et somatosensorielles *(Nithianantharajah et Hannan, 2006)*. b. Photos des environnements standard (SE) et enrichi (EE) utilisés dans notre laboratoire. Les souris en SE et EE sont élevés par groupes de 3 ou 4. Dans la cage EE, une maison, une roue, un tunnel et 1-2 jouets sont changés toutes les semaines.

b- Les effets de l'EE sur la plasticité cérébrale

Sur le plan neuroanatomique, une augmentation du poids et de la taille du cerveau (Rosenzweig and Bennett, 1969; Ferchmin et al., 1970), ainsi que de l'épaisseur du cortex a été observée chez des rats élevés en EE (Diamond et al., 1964), pouvant être associée à un phénomène de gliogénèse (Diamond et al., 1966 ; Szeligo and Leblond, 1966). Aussi, des modifications ont été mises en évidence au niveau des neurones avec une augmentation de

la taille des corps cellulaires et des noyaux (Diamond et al., 1966), une augmentation de la taille des contacts synaptiques (West and Greenough, 1972) et du nombre de synapses par neurone (Volkmar and Greenough, 1972; Turner and Greenough, 1985) ainsi qu'une augmentation du nombre d'épines dendritiques (Greenough et al., 1973). De surcroit, un large panel d'étude a permis de montrer que l'exposition à l'EE permet de restaurer des déficits de plasticité synaptique observés dans le vieillissement (Rosenzweig and Bennett, 1996; O'Callaghan et al., 2009) et dans les maladies neurodégénératives (van Praag et al., 2000; Nithianantharajah and Hannan, 2006; Laviola et al., 2008; Nithianantharajah and Hannan, 2009)).

Sur le plan biochimique, l'exposition de rongeurs à un EE induit une augmentation des taux de neurotrophines telles que le Nerve Growth Factor (NGF), le BDNF, et la neurotrophine NT-3 (Torasdotter et al., 1996, 1998; Ickes et al., 2000) ainsi que le Glial-cell Derived Neurotrophic Factor (GDNF) (Young et al., 1999). Ces modifications ont été observées dans le cortex (Torasdotter et al., 1996, 1998; Ickes et al., 2000) et l'hippocampe (Torasdotter et al., 1996, 1998; Young et al., 1999; Ickes et al., 2000). Pendant le développement, ces facteurs neurotrophiques jouent un rôle important dans la régulation des signaux extracellulaires de prolifération et de différenciation cellulaires (Calof, 1995) contribuant ainsi à la survie cellulaire. Au niveau moléculaire, Ferchmin et collaborateurs ont rapporté une augmentation de la quantité globale d'ARNm dans le cerveau de rats élevés en EE (Ferchmin et al., 1970). Depuis, et grâce à des analyses protéomiques et de puces à ADN, l'effet de l'EE sur le profil d'expression d'un large panel de gènes a pu être étudié. En effet, l'EE régule l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la fonction synaptique et la plasticité cellulaire. Ces modifications ont été observées dans le cortex (Rampon et al., 2000a), et l'hippocampe (McNair et al., 2007) de rongeurs exposés à un EE. Cependant, les effets bénéfiques de l'EE ne sont pas limités à ces deux régions mais s'étalent jusqu'au striatum. Dans notre laboratoire, Thiriet et collaborateurs ont récemment montré que l'EE régule l'expression de 48 gènes striataux impliqués dans différentes fonctions cellulaires comme la prolifération, la différentiation, la signalisation, la traduction, la transcription, ainsi que l'architecture cellulaire (Thiriet et al., 2008).

D'un autre côté, plusieurs études ont exploré l'effet de l'EE sur les neurotransmetteurs dont la sérotonine, la DA, la noradrénaline et le glutamate (pour revue (Solinas et al., 2010). Concernant le système sérotoninergique, il a été montré une augmentation du taux d'ARNm du récepteur 5HT1A dans l'hippocampe (Rasmuson et al., 1998) et le cortex frontal (Brenes et al., 2008) de rats élevés en EE. Une augmentation significative du taux hippocampique de sérotonine chez les rats élevés en EE a été corrélée positivement au temps de nage et négativement au temps d'immobilité effectués par les rats dans le test de la nage forcée (Brenes et al., 2009). Au niveau du système dopaminergique les études ont montré une diminution de la recapture de DA ainsi qu'une réduction du niveau de DAT dans le CPF (Zhu et al., 2004; Zhu et al., 2005) et le striatum (Bezard et al., 2003) de rongeurs élevés en EE. De plus, une augmentation de la libération de noradrénaline a été observée dans l'hippocampe (Galani et al., 2007; Brenes et al., 2009) et le striatum (Brenes et al., 2008) de rats élevés en EE. La transmission glutamatergique a aussi été associée à l'interaction EE et plasticité cérébrale. Des études du système glutamatergique ont montré que l'EE modifiait l'expression de sous-unités des récepteurs glutamatergiques AMPA (Naka et al., 2005) et NMDA (Tang et al., 2001). La diminution du taux de ces transporteurs induit une augmentation du taux synaptique de glutamate et donc une facilitation des mécanismes de plasticité tels que la potentialisation à long terme (LTP) dans l'hippocampe (Green and Greenough, 1986).

ii. Impact de l'EE dans divers modèles de dépendance aux drogues

Grâce à l'utilisation des modèles animaux de dépendance aux drogues il est possible de distinguer les effets « préventifs » de l'EE de ses effets « curatifs ». Ainsi, lors de l'étude de l'aspect préventif, les animaux sont exposés à l'EE avant tout contact avec la drogue tandis que l'étude des effets curatifs consiste en l'exposition des animaux à l'EE après l'exposition aux drogues et la mise en place des comportements liés à l'addiction. Dans ce qui suit, je présenterai les principaux résultats démontrant les effets préventifs et curatifs de l'EE.

a- Effets préventifs de l'EE contre la dépendance

Les principaux travaux consacrés à l'impact de l'EE sur l'addiction aux drogues d'abus ont eu lieu dans le laboratoire du Dr Bardo aux Etats-Unis. Ils ont ainsi exposés les animaux à l'EE depuis le sevrage jusqu'à l'âge adulte et les ont comparés à des animaux élevés dans des conditions d'isolement social. Leurs résultats indiquent que des rats exposés à l'EE ont une réponse locomotrice suite à une administration aigue d'AMPH et de cocaïne plus élevée que les rats isolés (Bowling and Bardo, 1994; Bardo et al., 1995; Green et al., 2009), mais pas dans le cas de la morphine (Bardo et al., 1997) et de la nicotine (Green et al., 2003). De même, et en utilisant le modèle de sensibilisation comportementale, ils ont pu démontrer une diminution de la sensibilisation à la morphine (Bardo et al., 1997), la nicotine (Green et al., 2003) et l'AMPH (Bardo et al., 1995) chez les rats élevés en EE. Dans le même laboratoire, ils ont utilisé des procédures d'auto-administration et ont trouvé une réduction des effets renforçants de l'AMPH et de la cocaïne chez les rats élevés en EE (Bardo et al., 2001; Green et al., 2002; Green et al., 2009). D'un autre côté, et de façon surprenante, les rats élevés en EE ne sont pas protégés contre les effets récompensants de l'AMPH puisque, dans un modèle de CPP, les animaux présentent une préférence de place élevée pour le compartiment associé à la drogue (Bowling and Bardo, 1994; Bardo et al., 1995).

Plus récemment, notre équipe de recherche s'est intéressée aux effets de l'EE chez la souris. Les souris EE présentent une diminution de la préférence pour le compartiment associé à la cocaïne dans un modèle de CPP ainsi qu'une diminution de la sensibilisation comportementale induite par cette même drogue (Solinas et al., 2008b; Solinas et al., 2009). De plus, ces souris présentent une activité locomotrice moindre suite à une injection aigue de cocaïne par rapport à des souris élevées en milieu standard (les animaux sont élevés en groupe mais sans aucun autre stimulus) (Bezard et al., 2003). Contrairement aux psychostimulants, une étude réalisée dans notre équipe sur les opiacés a montré qu'une exposition à l'EE pendant l'adolescence protège uniquement contre l'effet récompensants de l'héroïne dans un modèle de CPP (El Rawas et al., 2009), alors qu'une étude précédente a montré aussi une diminution des effets locomoteurs et de la sensibilisation comportementale induits par la morphine (Xu et al., 2007). De même, nous avons pu

démontrer récemment que l'exposition à l'EE ne protège pas contre les effets locomoteurs, récompensants et neurotoxiques de la METH (Thiriet et al., 2011), mettant en évidence l'extrême dangerosité de ce psychostimulant dont la popularité ne fait qu'augmenter *(cf. Chapitre 1)*. Sur le plan moléculaire, plusieurs études ont montré des modifications dans l'expression basale de gènes striataux (Bezard et al., 2003; Thiriet et al., 2008; Solinas et al., 2009), ainsi que dans l'expression de marqueurs d'activité neuronale induite par les drogues comme c-*fos* (Bezard et al., 2003; Solinas et al., 2008b), *zif-268* (Solinas et al., 2008b) et delta-fosB (Xu et al., 2007; Solinas et al., 2009) chez les souris élevées en EE. Ces neuroadaptations pourraient être impliquées dans la sensibilité aux propriétés récompensantes ou aversives des drogues et dans la diminution de la réactivité des neurones striataux à la cocaïne (Solinas et al., 2009).

b- Effets curatifs de l'EE contre la rechute

L'une des caractéristiques majeures de l'addiction est la rechute qui peut avoir lieu même après de longues durées d'abstinence. Notre équipe de recherche s'est donc posée la question de savoir si l'exposition des animaux à l'EE pendant la période de sevrage permet d'inverser les comportements associés à l'addiction, autrement dit l'EE pourrait-il être un traitement contre l'addiction ?

Notre équipe s'est particulièrement intéressée à la compréhension de l'influence de l'EE sur la recherche de cocaïne et la réinstallation du comportement d'auto administration. En utilisant un modèle animal de recherche de drogue, la préférence de place conditionnée, on a pu montrer que l'exposition de souris à un EE pendant la période de sevrage élimine l'expression de la préférence de place associée à la cocaïne (Solinas et al., 2008a ; Chauvet et al., 2011). Cette rechute à la cocaïne est associée à la diminution de la réactivité de l'ensemble des régions cérébrales impliquées dans la rechute. En effet, l'exposition à l'EE diminue l'expression de la protéine c-Fos dans des régions corticales (le cortex cingulaire antérieure et le cortex orbitofrontal), ainsi que dans des régions motrices et limbiques comme le CPu, le Shell du NAc, le gyrus denté de l'hippocampe, l'ATV, le BNST, la BLA et le CeA (Solinas et al., 2008a ; Chauvet et al., 2011). En utilisant un modèle d'auto-

administration de cocaïne chez le rat, nous avons montré qu'un mois d'exposition à l'EE pendant la période de sevrage est nécessaire pour diminuer le comportement de recherche de cocaïne induit par le stress (induit par une injection de Yohimbine) (Chauvet et al., 2009) et les indices environnementaux (Chauvet et al., 2009 ; Chauvet et al., 2012). Contrairement à l'effet observé chez les souris dans un modèle de CPP, l'exposition à l'EE n'inhibe pas la rechute induite par la cocaïne dans le même modèle (Chauvet et al., 2009).

Ces résultats précliniques sont en accord avec les études cliniques montrant que différentes formes de stimulation pourraient être bénéfiques pour traiter l'addiction aux drogues d'abus (Setlow, 2008; Schnabel, 2009) et permettent de démontrer qu'un environnement positif peut faciliter l'abstinence et réduire les risques de rechute. Ainsi, ces résultats suggèrent que la période d'abstinence constitue une opportunité thérapeutique très importante pour le traitement de l'addiction (pour revue : (Solinas et al., 2010)).

F- Impact environnemental sur les processus neurotoxiques

Les facteurs environnementaux semblent aussi moduler la vulnérabilité ou la résistance aux processus neurotoxiques observés soit dans le cadre de pathologies, soit suite à l'exposition à des substances neurotoxiques. Comme dans la section précédente, nous commenterons l'impact du stress et de l'environnement enrichi sur ces processus.

1. Impact des facteurs de stress sur les processus neurotoxiques

i. Effets toxiques du stress dans les régions corticolimbiques

Des études réalisées chez les rongeurs ont permis de mettre en évidence que le stress et l'excès de glucocorticoïdes induisent des effets néfastes au niveau du système nerveux central. Ainsi, au niveau morphologique, un stress chronique est capable d'induire une rétractation des dendrites, ainsi qu'une diminution du nombre de branchements dendritiques dans l'hippocampe (Bisagno et al., 2000) et le CPF (Radley et al., 2004). Ces anomalies sont accompagnées de changements morphologiques du corps cellulaire

(condensation et rétraction nucléaire) (Sapolsky, 1999) et semblent être dépendantes des glucocorticoïdes (pou revue : (Sapolsky, 2003)). Cette toxicité induite par un excès de glucocorticoïdes ne s'arrête pas aux neurones. En effet, le stress et les glucocorticoïdes agissent sur d'autres types de cellules tels que les cellules gliales au niveau du CPF (Banasr et al., 2007). Comme ces cellules sont indispensables pour le soutien métabolique et la survie des neurones, une atteinte de leurs fonctions altère la plasticité cérébrale. Un autre phénomène pouvant être modulé par les glucocorticoïdes est la neurogénèse hippocampique. Ainsi, le stress et les glucocorticoïdes agiraient comme inhibiteurs de la neurogénèse : des rats ayant reçu un traitement aigu à la corticostérone présentent une diminution du nombre de nouveaux neurones formés dans le gyrus denté alors qu'une suppression des glandes surrénales induit l'effet inverse (Cameron and Gould, 1994).

ii. Impact du Stress sur les processus neurotoxiques

Etant donné sa richesse en récepteurs aux glucocorticoïdes, l'hippocampe constitue une région cérébrale très sensible aux modifications de concentration de ces hormones. Il a été mis en évidence qu'une exposition prolongée aux glucocorticoïdes fragilisait les neurones hippocampiques et diminuait leur potentiel de survie dans des modèles de lésions cérébrales et de maladies neurodégénératives (Sapolsky, 1985; Sapolsky and Pulsinelli, 1985; Sotiropoulos et al., 2011). Par exemple, Sapolsky et Pulsinelli ont été parmi les premiers à démontrer que l'administration de glucocorticoïdes augmentait les lésions hippocampiques induite par une ischémie cérébrale alors qu'une adrénalectomie post-ischémie diminuait ces lésions (Sapolsky and Pulsinelli, 1985). Il a aussi été montré qu'un stress chronique et l'administration de glucocorticoïdes sont capables d'induire une hyperphosphorylation de la protéine Tau (Sotiropoulos et al., 2008; Sotiropoulos et al., 2011), une anomalie biochimique caractéristique de la maladie d'Alzheimer. Les effets des glucocorticoïdes sur la survie neuronale passent probablement par un phénomène d'excitotoxicité glutamate-dépendant. L'exposition à un stress aigu ou chronique induit une augmentation du taux de glutamate dans plusieurs régions cérébrales dont l'hippocampe (Moghaddam et al., 1994; Venero and Borrell, 1999; Sunanda et al., 2000). Cet effet est complètement bloqué suite à une adrénalectomie (Lowy et al., 1993).

Le stress intervient aussi dans la toxicité induite par la METH. Plusieurs études ont montré que, quand ils sont exposés à un stress chronique imprédictible avant la prise de METH, les rats deviennent plus vulnérables aux effets neurotoxiques de la drogue : ils présentent une hyperthermie et une diminution des taux tissulaires de DA striatale plus importantes que celles observées chez les rats non stressés (Matuszewich and Yamamoto, 2004a, 2004b), ainsi qu'une diminution du taux de sérotonine striatale (Tata et al., 2007). Il semblerait que les mécanismes cellulaires et moléculaires par lesquels le stress amplifie la neurotoxicité induite par la METH font intervenir l'action conjointe de plusieurs processus (Figure 18). Tout d'abord, les glucocorticoïdes peuvent induire un état de stress oxydatif. En effet, il a été montré que l'excès de glucocorticoïdes ou un stress chronique induisaient (1) une accumulation d'espèces réactives oxygénées dans des neurones hippocampiques en culture (McIntosh and Sapolsky, 1996), (2) une accumulation de NO dans des homogénats de cerveaux entiers (Matsumoto et al., 1999), ainsi qu'une (3) diminution de l'activité d'enzymes antioxydantes (Matsumoto et al., 1999) favorisant ainsi l'action toxique des radicaux libres. De même, l'administration de glucocorticoïdes induit une diminution de l'activité de la CuZnSOD au niveau du cortex, de l'hippocampe et du cervelet (McIntosh et al., 1998). Rappelons que des souris transgéniques surexprimant cette enzyme sont protégées contre la neurotoxicité de la METH (Cadet et al., 1994) *(cf. chapitre 1)*. D'un autre côté, un stress chronique imprédictible accentue l'augmentation de glutamate extracellulaire induite par la METH, dans l'hippocampe et le striatum, et ainsi l'activation de la NOS et la production de NO (pour revue (Tata and Yamamoto, 2007)). Dans ce cadre, le stress peut aussi inhiber l'activité des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale induisant alors un dysfonctionnement des mitochondries (Madrigal et al., 2001).

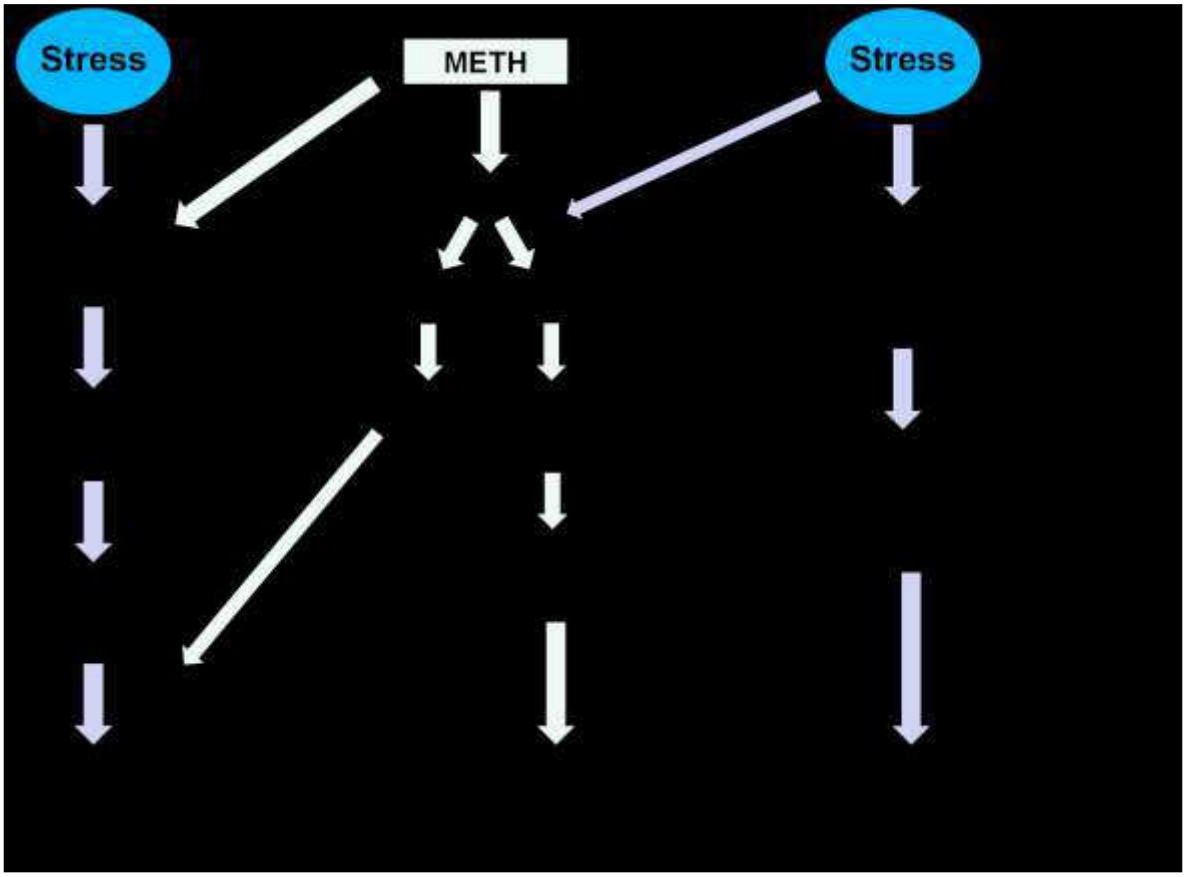


Figure 18. Interactions entre METH et stress.
Le stress contribue aux effets neurotoxiques induits par la METH via 3 voies distinctes mais interdépendantes. La première voie est celle du stress oxydatif induit par l'auto-oxydation de la DA. La deuxième voie est celle de l'excitotoxicité induite par le glutamate. Et la troisième voie est celle du dysfonctionnement mitochondrial. (d*'après (Tata et Yamamoto, 2007))*
DA: dopamine, VMAT-2: transporteur vésiculaire de monoamine type 2, ROS: espèces réactives oxygénées, RNS: espèces réactives nitorgénées, NO:monoxyde d'azote

2. Impact de l'Environnement Enrichi sur les processus neurotoxiques

i. Impact de l'EE sur les maladies neurodégénératives

Dans les modèles animaux de la maladie de Parkinson, l'exposition à l'EE avant et après lésion a montré des effets bénéfiques. En effet, dans un modèle animal de Parkinson utilisant la neurotoxine MPTP (1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine), l'EE rend les souris plus résistantes à la toxicité induite par cette molécule : les souris élevées en EE ont

une perte de neurones dopaminergiques moins importantes que les souris élevées en SE, associée à une diminution de l'expression des DAT (Bezard et al., 2003; Faherty et al., 2005). De même, et dans un autre modèle animal, le modèle 6-OHDA, l'exposition des rats à un EE après l'injection de la toxine permet d'améliorer leurs fonctions motrices (Jadavji et al., 2006). Par ailleurs, l'augmentation de la fréquence et de l'intensité de l'activité physique avant l'injection de neurotoxines dopaminergiques (la 6-OHDA et le MPTP) permet de prévenir la dégénérescence dopaminergique striatale (Tillerson et al., 2003) et d'améliorer les performances motrices chez les rongeurs (Kleim et al., 2003).

Enfin, il a aussi été démontré que l'EE est capable de modifier des aspects comportementaux, cellulaires et moléculaires caractéristiques de la maladie d'Alzheimer chez des souris transgéniques (pou revue : (Laviola et al., 2008)). Par exemple, des souris mutantes pour le gène du précurseur de la protéine amyloïde, exposées à un EE au moins 1h et ce 3 fois par semaine, présentent (1) de meilleurs performances cognitives, (2) une diminution du dépôt des plaques β-amyloïdes ainsi que (3) une augmentation du nombre de connexions synaptiques dans l'hippocampe (Cracchiolo et al., 2007).

ii. Impact de l'EE sur les processus neurotoxiques induits par les psychostimulants

Comme vu dans le chapitre précédent, la neurotoxicité induite par la METH est la résultante de l'action conjointe de plusieurs mécanismes de toxicité cellulaire, qui sont aussi générés par les neurotoxines MPTP et 6-OHDA et peuvent être prévenus par une exposition à un EE. Par exemple, Herring et collaborateurs ont montré que, dans un modèle murin transgénique de la maladie d'Alzheimer, une stimulation environnementale (1) diminuait l'expression de marqueurs de stress oxydatif tels que la nitrotyrosine, (2) diminuait l'expression des caspases pro-apoptotiques Casp3, Casp6 et Casp9, et (3) augmentait l'expression des enzymes détoxifiantes SOD1 et SOD2 (Herring et al., 2009). Par ailleurs, plusieurs études ont montré que l'EE induit une diminution de l'expression de DAT, l'une des principales cibles de la METH, dans la substance noire (Yuan et al., 2009) et le striatum (Bezard et al., 2003).

Cette protection induite par l'EE contre les processus neurotoxiques nous a poussé à nous intéresser à l'effet de l'EE sur la neurotoxicité induite par la METH. Contrairement à la protection induite contre la toxicité de la 6-OHDA et du MPTP, et en accord avec une étude précédente (Gehrke et al., 2006), l'exposition à l'EE ne diminue ni la perte des terminaisons neuronales ni l'apoptose déclenchées par la METH (Thiriet et al., 2011). Ainsi, cette absence de protection de l'EE met en lumière la dangerosité de la METH qui voit sa popularité grandir, et incite à chercher d'autres facteurs de protection contre ses effets neurotoxiques.

Chapitre 3 – Le Système Cannabinoïde Endogène

Le système cannabinoïde endogène (SCE) est un système neuromodulateur impliqué dans divers processus physiologiques et pathologiques comme la récompense, l'apprentissage, et, le plus intéressant pour notre travail, la neuroprotection (van der Stelt et

Di Marzo, 2005). Dans ce chapitre, je présenterai (1) les différents composants du SCE, (2) son rôle dans l'addiction aux drogues, (3) son implication dans la régulation des systèmes du stress, et (4) quelques uns des mécanismes qui sous-tendent son rôle neuroprotecteur.

A- Généralités

Provenant d'une plante appelée *Cannabis Sativa*, le cannabis, ou chanvre, était utilisé dans l'Antiquité comme source de fibres, dans la fabrication de tissus et de cordage. Grâce à ses propriétés médicinales, le cannabis a vu son utilisation thérapeutique se répandre en Inde, au Moyen-Orient, en Egypte puis en Occident au XIX^{ème} siècle. Il fut surtout prescrit en tant qu'analgésique, anesthésiant, anti-inflammatoire et antiémétique. Au début du XX^{ème} siècle, des chercheurs ont réussi à isoler les différents composés du cannabis : le cannabinol, le cannabidiol et le tétrahydrocannabinol. Dans les années 60, Raphael Mechoulam et collaborateurs réussirent à isoler le principal actif du cannabis, le delta-9-tétrahydrocannabinol (THC) (Gaoni et Mechoulam, 1964). C'est en cherchant à caractériser les mécanismes par lesquels le THC exercerait ses effets physiologiques et comportementaux que le SCE fut découvert.

G- Les composants du système cannabinoïde endogène

Le SCE regroupe : les récepteurs cannabinoïdes, leurs ligands endogènes, dits endocannabinoïdes (ECs), et les enzymes de synthèse et de dégradation des ECs.

1. Les Récepteurs Cannabinoïdes

Les cannabinoïdes agissent principalement via deux récepteurs métabotropiques à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G, les récepteurs CB1 et CB2. Cependant d'autres récepteurs ont été identifiés. Comme pour le principe actif du cannabis, l'étude des récepteurs cannabinoïdes s'est révélée très laborieuse. Ce n'est qu'en 1988, en utilisant un cannabinoïde mimant les effets du THC (CP-55,940), que Devane et collaborateurs ont réussi à mettre en évidence l'existence de sites de liaison des

cannabinoïdes exogènes dans le cerveau de rat (Devane et al., 1988). Pourtant, la structure moléculaire de ces sites de liaison n'était pas déterminée.

i. Le récepteur CB1

Le premier récepteur, identifié et cloné à partir de cerveau de rat, fut le récepteur des cannabinoïdes de type 1 (récepteur CB1) (Matsuda et al., 1990). Au niveau du système nerveux central, le récepteur CB1 est majoritairement exprimé dans les cellules nerveuses, et, plus faiblement, dans les cellules gliales (Herkenham et al., 1990). Sa large distribution correspond aux structures cérébrales impliquées dans les effets principaux du cannabis sur les perceptions sensorielles, la mémoire et le contrôle moteur. La localisation de ce récepteur a été réalisée grâce à des études d'immunohistochimie et d'autoradiographie (Herkenham et al., 1990; Herkenham et al., 1991; Moldrich and Wenger, 2000). En effet, le récepteur CB1 est hautement exprimé dans des régions impliquées dans le contrôle du mouvement telles que le noyau caudé, le globus pallidus et la substance noire réticulée. On retrouve une grande densité de CB1 dans le cortex préfrontal, centre d'intégration des fonctions cognitives, et le cortex cingulaire, avec une plus grande densité dans les couches 1 et 6. Les CB1 sont aussi très exprimés au niveau de l'hippocampe, et plus particulièrement dans le gyrus denté et la région CA3. Concernant le système dopaminergique mésolimbique, impliqué dans les processus de motivation et de récompense (Robinson and Berridge, 2003), ce récepteur est surtout présent au niveau des terminaisons nerveuses striatales, et moins exprimé dans l'ATV et l'amygdale (Herkenham et al., 1990; Tsou et al., 1998). En dehors du SNC, les CB1 sont faiblement exprimés au niveau des terminaisons nerveuses périphériques, notamment dans la vessie (Pertwee, 2001a), le tissu adipeux (Cota et al., 2003) et l'intestin (Pertwee, 2001b).

ii. Le récepteur CB2

Plus tard, le récepteur des cannabinoïdes de type 2 (récepteur CB2) fut identifié dans la rate et le système immunitaire, grâce à une PCR mise en place pour isoler les récepteurs couplés aux protéines-G (Munro et al., 1993). Il a été initialement considéré comme ayant une expression exclusivement périphérique. On le retrouve notamment au niveau des cellules immunitaires (lymphocytes T et B, les monocytes) (Carlisle et al., 2002; Klegeris et al., 2003), ainsi qu'au niveau du muscle squelettique (Cavuoto et al., 2007) et de l'épiderme (Casanova et al., 2003). Grâce à des études de PCR quantitative et d'immunohistochimie plus récentes, il a été suggéré une faible expression du récepteur CB2 dans certaines régions cérébrales comme le striatum, l'hippocampe et l'amygdale (Van Sickle et al., 2005; Gong et al., 2006; Onaivi et al., 2006).

iii. Signalisation des récepteurs CB1 et CB2

Les récepteurs CB1 et CB2 sont principalement couplés aux protéines G trimériques et peuvent, de ce fait, initier divers évènements intracellulaires typiques des récepteurs couplés aux protéines G (pour revue (Howlett et al., 2002)). Ils activent notamment 3 voies de signalisation cellulaire décrites ci-dessous (Figure 19).

a- La voie de l'adénylate cyclase

Des études utilisant des coupes de cerveau de rats et des cultures de neurones ont permis de démontrer que les cannabinoïdes, dont le THC, ont la capacité d'inhiber l'adénylate cyclase, de façon réversible, dose-dépendante et stéréosélective (Howlett and Fleming, 1984; Howlett et al., 1986). Cette inhibition a été caractérisée dans les cellules neuronales exprimant le récepteur CB1, ainsi que dans des lymphocytes humains et des cellules de la moelle osseuse de souris exprimant le récepteur CB2 (Matsuda et al., 1990; Griffin et al., 1997). De plus, cette inhibition induite par les cannabinoïdes est un évènement cellulaire bloqué d'une part par la toxine pertussique, impliquant ainsi les protéines $G_{i/o}$ dans la transduction du signal (Howlett et al., 1986), et d'autre part par l'administration d'un antagoniste du récepteur CB1 (SR141716A) (Rinaldi-Carmona et al., 1994).

b- La voie des MAP kinases

L'activation des récepteurs CB1 et CB2 déclenche l'activation de la voie des MAP kinases, et plus spécifiquement celles des kinases ERK (Bouaboula et al., 1995; Bouaboula et al., 1996), P38 (Derkinderen et al., 2001) et JNK (c-Jun N-terminal Kinase) (Downer et al., 2003). Cette activation aboutit *in fine* à l'activation de divers facteurs de transcription tels que c-fos et c-jun (Bouaboula et al., 1995; Derkinderen et al., 2003). Cette activation de la voie des MAP kinases est aussi bloquée par la toxine pertussique et l'administration de l'antagoniste du récepteur SR141716A (Bouaboula et al., 1995), confirmant ainsi l'implication des récepteurs CB1. Elle est la conséquence de 3 événements intracellulaires en amont : (1) la diminution de production de l'AMPc (Derkinderen et al., 2003); (2) l'activation de la Phosphatidyl Inositol 3-Kinase conduisant à l'activation de ERK et JNK (Rueda et al., 2000); (3) l'activation de la synthèse de céramides par les cannabinoïdes, un processus encore peu connu et qui serait impliqué dans le potentiel anticancéreux des cannabinoïdes (pour revue (Guzman, 2003)).

c- Les canaux ioniques

L'activation du récepteur CB1 inhibe les canaux calciques voltage-dépendants de type N et Q/P (Mackie and Hille, 1992; Mackie et al., 1995; Twitchell et al., 1997). Ces canaux calciques sont principalement exprimés au niveau présynaptique et sont indispensables pour la libération de neurotransmetteurs dans le SNC (Takahashi and Momiyama, 1993). Leur modulation par les récepteurs CB1 met en évidence le rôle des cannabinoïdes, endogènes et exogènes, dans la modulation des transmissions synaptiques (pour revue (Schlicker and Kathmann, 2001)). Par ailleurs, les ECs sont capables de réguler l'activité des canaux potassiques (Mackie et al., 1995), impliqués aussi dans l'inhibition présynaptique de la libération de GABA et de glutamate (Kreitzer et al., 2002). Enfin, et contrairement aux CB1, l'activation des récepteurs CB2 semble n'avoir aucun effet sur l'inhibition des canaux calciques et potassiques (Felder et al., 1995).

iv. Autres récepteurs fixant les cannabinoïdes

La majorité des effets des cannabinoïdes passent par les récepteurs CB1 et/ou CB2. Cependant, des études réalisées avec des souris invalidées pour les gènes de ces récepteurs (CB1, CB2 ou CB1/CB2), ainsi que des études pharmacologiques de ces récepteurs ont permis de mettre en évidence la présence d'effets biologiques induits par les cannabinoïdes via d'autres récepteurs (pour revue (Howlett et al., 2002)). En effet, l'anandamide, en plus d'autres lipides, est capable d'activer le récepteur vanilloïde (ou TRPV1 : Transient Receptor potential vanilloide 1) (Di Marzo et al., 2001), un récepteur canal s'ouvrant sous l'effet d'un stimulus thermique supérieur à 48°C, et induisant, entre autres, une stimulation de l'apoptose de cellules de lymphome et de neuroblastome (Maccarrone et al., 2000). Par ailleurs, les cannabinoïdes peuvent aussi se lier au récepteur GPR55 (G-Protein coupled Receptor 55), préférentiellement exprimé dans les glandes surrénales et le cerveau, mais dont les effets ne sont pas encore bien connus (Ryberg et al., 2007).

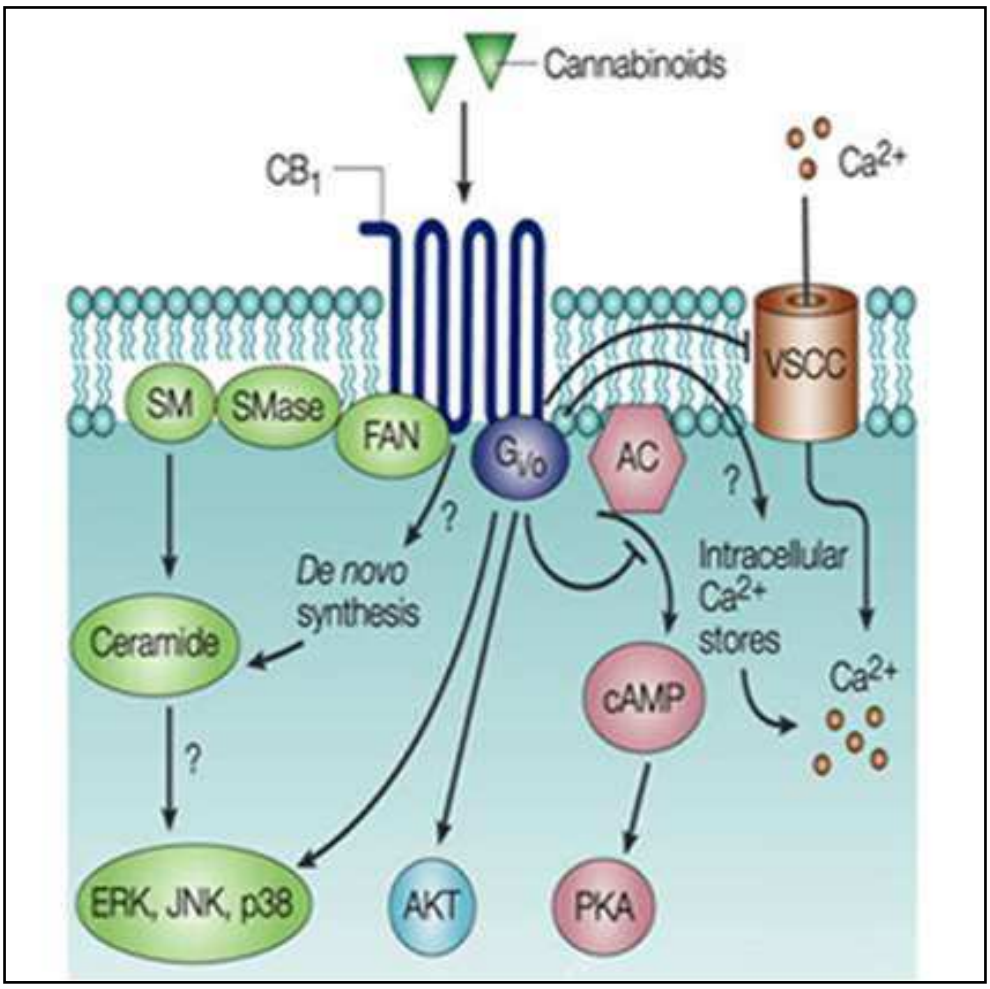


Figure 19. Principales voies de signalisation des récepteurs cannabinoïdes.
La voie de l'adénylate cyclase (AC) - AMP cyclique – protéine kinase A (PKA). La modulation de la conductance ionique par inhibition des canaux calciques voltage-dépendants (VSCC) et libération du Ca^{2+} dans le cytoplasme. L'activation directe de la voie des MAP kinases (extracellular signal-regulated kinase (ERK), Jun N-terminal Kinase (JNK) et p38) et via l'activation de la voie phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-AKT et la génération de céramides. *(Guzman et al, 2003)*

2. Les Endocannabinoïdes

Les premiers ECs qui ont été identifiés et caractérisés sont l'anandamide (Devane et al., 1992; Di Marzo et al., 1994) et le 2-arachidonoylglycérol (2-AG) (Mechoulam et al., 1995).

i. L'Anandamide

La synthèse de l'anandamide se fait en deux étapes. Dans un premier temps, la N-acétyltransférase catalyse le transfert d'un acide arachidonique sur l'éthanolamine de la

phosphatidyléthanolamine, produisant ainsi le précurseur lipidique de l'anandamide, le N-arachidonoyl-phosphatidyléthanolamine (NAPE). Cette étape nécessite l'intervention de deux seconds messagers intracellulaires : le calcium et l'AMPc (Cadas et al., 1997) (Figure 20). Dans un deuxième temps, le NAPE est clivé par une Phospholipase D (PLD), libérant ainsi l'anandamide et un acide phosphorique. Cette étape est dépendante du Ca^{2+} (Devane et al., 1992; Piomelli et al., 1999). On trouve les concentrations les plus fortes d'anandamide dans l'hippocampe, le striatum, le cervelet et le cortex, des zones où l'expression de CB1 est très importante (Di Marzo et al., 1994; Felder et al., 1996). Ceci est en corrélation avec les affinités pharmacologiques de l'anandamide. En effet, l'anandamide présente une plus forte affinité pour le récepteur CB1 (Ki=72nM) que pour le récepteur CB2 (Ki=279nM), mais peut aussi, à de fortes concentrations, interagir avec d'autres récepteurs non cannabinoïdes comme le TRPV1 et le GPR55 (Di Marzo, 2008) .

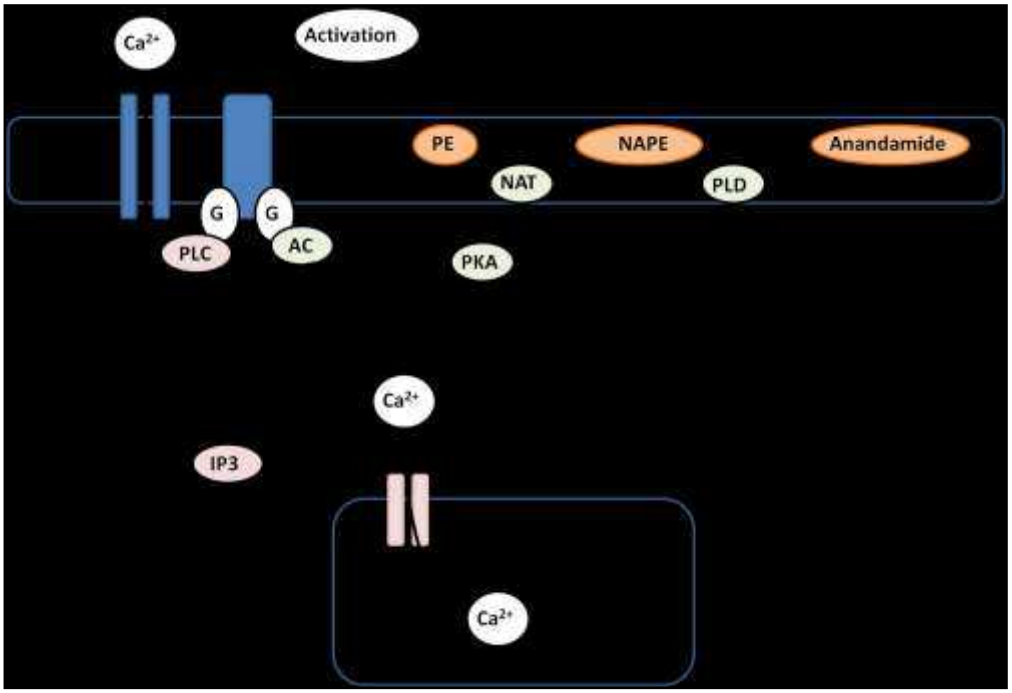


Figure 20. Mécanisme de synthèse de l'anandamide. *(d'après la revue (Cadas et al, 1997))*
PLC : phospholipase C ; AC : adénylate cyclase ; PKA : protéine kinase A ; IP3 : inositol-1,4,5-triphosphate ; IP3R : récepteur IP3 ; NAT : N-acétyltransférase ; PE : phosphatidyl éthanolamine ; NAPE : N-arachidonoyl PE ; PLD : phospholipase D.

ii. Le 2-arachidonoylglycérol

Comme tout monoacylglycérol, le 2-AG se trouve à l'intersection de plusieurs voies du métabolisme lipidique pouvant être aussi bien le produit final d'une voie que le précurseur d'une autre. Néanmoins deux principales voies de synthèse du 2-AG ont été identifiées jusqu'à présent (Piomelli, 2003) (Figure 21). La première voie consiste en un clivage du phosphatidylinositol par la phospholipase 1 (PLA1) produisant le 2-arachidonoyl-lysophospholipide, qui sera à son tour hydrolysé par la phospholipase C (PLC) pour produire le 2-AG. La deuxième voie de synthèse consiste en un clivage du phosphatidylinositol par la PLC produisant le 1,2-diacylglycérol (DAG) (Stella et al., 1997). A son tour, le DAG est hydrolysé par la DAG lipase libérant ainsi le 2-AG.

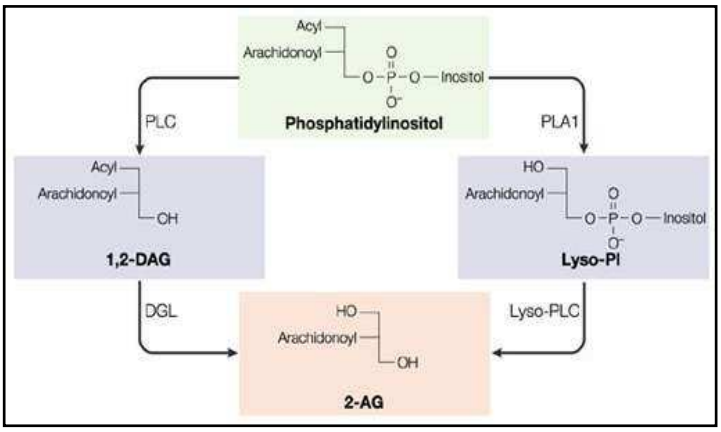


Figure 21. Deux principales voies de synthèse du 2-AG ont été identifiées *(Piomelli, 2003)*

Des travaux réalisés sur des coupes d'hippocampe ont montré que la production de 2-AG serait dépendante du Ca^{2+} (Stella et al., 1997). L'activation de la PLC nécessite l'activation de divers récepteurs métabotropiques dépendants du Ca^{2+} tels que les mGluR1 et les mGluR5. A son tour, la PLC induit la synthèse d'IP3 (inositol-1,4,5-triphosphate) responsable de la libération du Ca^{2+} séquestré dans les réticulums endoplasmiques (Figure 22). De plus, et contrairement à l'anandamide, le 2-AG présente une affinité similaire pour les récepteurs CB1 et CB2 (Stella et al., 1997).

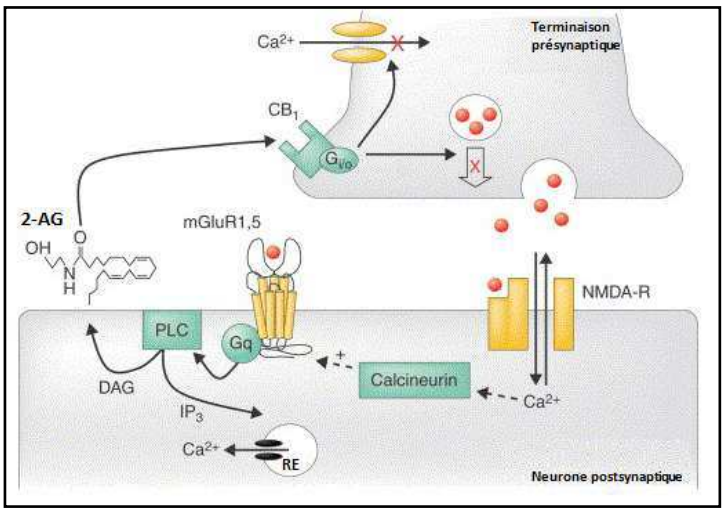


Figure 22. Mécanismes impliqués dans la synthèse du 2-AG via la PLC. *(d'après Doherty et Dingledine, 2003)*
2-AG : 2-arachidonoylglycérol ; PLC:phospholipase C; DAG:1,2-diacylglycérol; IP3 : inositol-1,4,5-triphosphate ; RE :réticulum endoplasmique

iii. Autres ECs

En plus de l'anandamide et le 2-AG, plusieurs cannabinoïdes endogènes activant les récepteurs CB1 et/ou CB2 ont également été isolés. On retrouve notamment la Noladine et la Virodhamine (Figure 23). La Noladine, ou 2-arachidonoyl glyceryl ether, a été isolée à partir d'extraits de cerveau de porc (Hanus et al., 2001). Elle est fortement exprimée dans le thalamus et l'hippocampe (Fezza et al., 2002) et agit comme agoniste des récepteurs CB1 et CB2, mais avec une plus grande affinité pour le récepteur CB1 ($Ki_{(CB1)}$=9.1nM ; $Ki_{(CB2)}$=480nM). Son administration *in vivo* induit un effet sédatif, hypothermique et antinociceptif (Hanus et al., 2001). La Virodhamine, ou O-arachidonoyl éthanolamine, a été découverte chez le rat (Porter et al., 2002). Elle est constituée d'une molécule d'acide arachidonique liée à une molécule d'éthanolamine par une liaison ester. Elle est produite principalement dans le cortex et l'hippocampe, à des concentrations semblables à celles de l'anandamide, et agit comme antagoniste du récepteur CB1 et agoniste total du récepteur CB2 (Porter et al., 2002). Sa synthèse et sa dégradation ne sont pas très bien connues, mais il semblerait que cette molécule instable soit convertie en anandamide et pourrait donc être dégradée par les mêmes voies que cette dernière (Porter et al., 2002). Quand elle est administrée *in vivo*, la virodhamine induit une hypothermie (Porter et al., 2002).

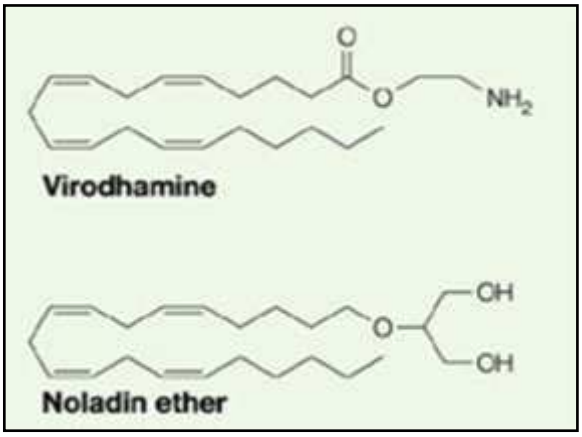


Figure 23.Structure chimique de la Virodhamine et la Noladine. *(Piomelli, 2003)*

iv. Les ECs sont synthétisés à la demande

Etant donné leur caractère lipophile, les ECs ne sont pas stockés dans des vésicules au niveau des terminaisons nerveuses mais diffusent librement après leur production. Ils sont synthétisés, à partir des lipides membranaires, et libérés « à la demande » suite à des changements spécifiques, qui ont lieu dans des neurones exprimant les enzymes de synthèse des ECs (Di Marzo et al., 1994; Bisogno et al., 1997; Liu et al., 2006). Un premier évènement pouvant déclencher la synthèse d'ECs est l'activation des récepteurs d'autres systèmes de neurotransmission, exprimés par le neurone postsynaptique. Par exemple, il a été montré que l'activation des récepteurs NMDA induit la synthèse du 2-AG (Stella et Piomelli, 2001), tandis que la synthèse de l'AEA a lieu par activation des récepteurs dopaminergiques D2 (Giuffrida et al, 1999) ou par une co-activation des récepteurs NMDA et des récepteurs cholinergiques nicotiniques (Stella et Piomelli, 2001). Un autre stimulateur de la synthèse d'ECs est la dépolarisation de la membrane postsynaptique qui induit l'ouverture de canaux calciques dépendants du voltage, augmentant ainsi la concentration intracellulaire de Ca2+ (Di Marzo et al, 1998). Cette synthèse peut être aussi induite, indépendamment du Ca^{2+}, par activation des mGluR (Varma et al, 2001).Tous ces évènements activent les enzymes N-acétyltransférase et PLC, sensibles au Ca^{2+}, induisant alors la synthèse d'ECs (Figures 20 et 22).

v. Les ECs : des messagers rétrogrades

Suite à leur synthèse au niveau du neurone postsynaptique, les ECs sont libérés soit par diffusion passive, étant donné leur nature lipophile, soit par diffusion facilitée, grâce à des protéines d'ancrage comme la lipocaline (pour revue (Freund et al., 2003; Piomelli, 2003). Une fois dans la fente synaptique, ils fonctionnent comme messagers rétrogrades : les ECs agissent à l'inverse des neurotransmetteurs classiques pour moduler, de manière transitoire ou durable, la libération de neurotransmetteurs par le neurone présynaptique (Figure 24). Ce phénomène a été observé pour la première fois en 1991, quand Marty et collaborateurs ont constaté que la dépolarisation des cellules de Purkinje cérébelleuses diminuait, pendant une courte durée, les évènements inhibiteurs GABAergiques sur le neurone postsynaptique (Llano et al, 1991). Ce phénomène dit « suppression de l'inhibition induite par une dépolarisation » (DSI :depolarization-induced suppression of inhibition), d'origine présynaptique, a été observé aussi au niveau des neurones hippocampiques (Pitler et Alger, 1992). Et ce n'est qu'une décennie plus tard qu'on a réussi à démontrer que ce phénomène est dépendant des récepteurs CB1 présynaptiques et qu'un mécanisme semblable existe aussi au niveau des synapses excitatrices glutamatergiques (DSE : depolarization-induced suppression of excitation) (pour revue : (Wilson et Nicoll, 2002)).

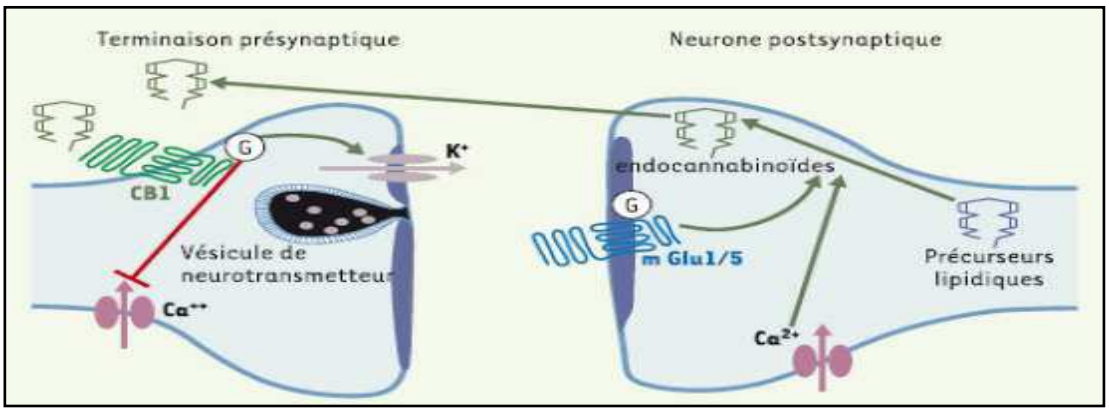


Figure 24. Les ECs sont des messagers rétrogrades. *(Venance et al, 2004)*
Une fois libérés par le neurone postsynaptique, ils agissent sur les récepteurs CB1 présynaptiques afin de réguler la libération de neurotransmetteurs.

vi. La métabolisation des ECs

La métabolisation des ECs se fait en deux étapes : la recapture puis la dégradation proprement dite.

- ***La recapture***

Les mécanismes de recapture des ECs dans le cytosol ne sont pas encore très bien définis. Ils peuvent traverser la membrane plasmique soit par diffusion passive, grâce à leur nature lipophile, soit par diffusion facilitée grâce à un système de transporteur, indépendant de l'énergie, exprimé aussi bien par les cellules nerveuses que par les cellules gliales (Hillard et al., 1997; McFarland and Barker, 2004)) (Figure 25). Plusieurs outils pharmacologiques ont permis d'étudier ces mécanismes de recapture, notamment l'AM404 qui inhibe la recapture des ECs et induit une augmentation de leur taux extracellulaire , ainsi qu'un prolongement de leurs effets (Piomelli et al., 1999).

- ***La dégradation***

Une fois passés à l'intérieur de la cellule, l'anandamide et le 2-AG sont hydrolysés par deux enzymes différentes. En effet, l'anandamide est hydrolysé par la fatty acid amide hydrolase (FAAH) (Ueda et al., 1995; Kathuria et al., 2003) en acide arachidonique et éthanolamine. La FAAH est largement présente dans le SNC (Desarnaud et al., 1995; Freund et al., 2003). Elle est exprimée dans le neurone postsynaptique, où elle est ancrée aux membranes intracellulaires de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique (Egertova et al., 2003) (Figure 26). Quant au 2-AG, il est hydrolysé en un glycérol et un acide arachidonique par la monoacylglycérol lipase (MGL) présente dans les terminaisons présynaptiques exprimant le récepteur CB1 (Dinh et al., 2002) (Figure 25).

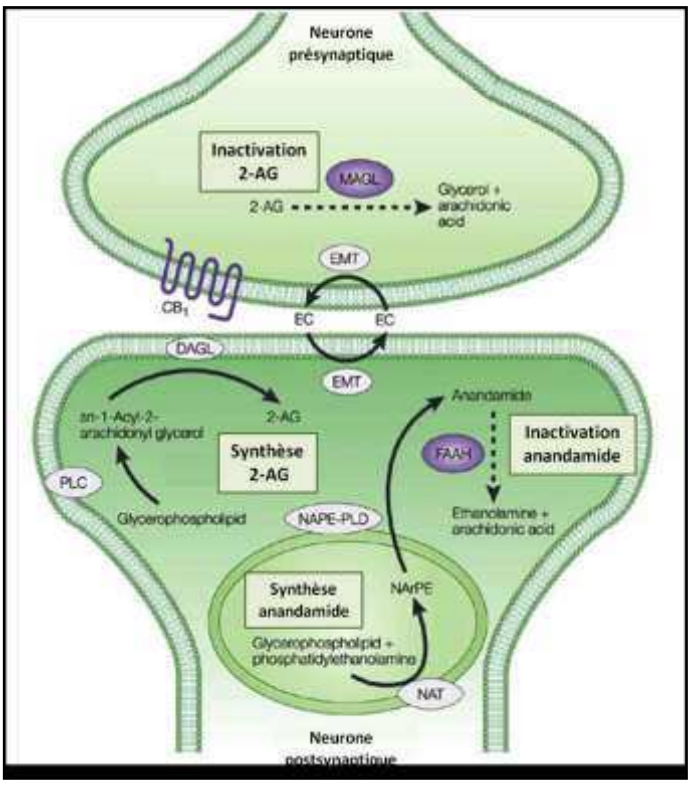


Figure 25. Localisation des mécanismes de synthèse et de dégradation des ECs. *(d'après (Di Marzo et al., 2004))*
EMT : endocannabinoid membrane transporter ; EC : endocannabinoid ; PLC : phospholipase C ; DAGL : diacylglycérol lipase ; NAT : n-acetyl transférase ; NAPE : n-arachidonoyl phosphatidylethanolamine ; NAPE-PLD : NAPE-phospholipase D ; MAGL : monoacyl glycérol lipase.

H- SCE et système de récompense

Plusieurs observations ont permis de mettre en évidence une interaction entre le SCE et le système de récompense. En effet, les récepteurs CB1 sont exprimés dans des régions cérébrales impliquées dans les processus de récompense tels que le CPF, le striatum et l'ATV (Herkenham et al, 1990). De plus, l'activation des récepteurs CB1 par des agonistes naturels (ex. THC) ou synthétiques (ex. Win 55,212-2) stimule la neurotransmission dopaminergique (French, 1997; Tanda et al., 1997). Par ailleurs, les taux d'ECs sont modulés par l'activation du système de récompense (Di Marzo et al., 2000 ; Gonzalez et al., 2002). Dans ce qui suit, j'exposerai les interactions qui ont lieu entre le SCE et le système de récompense.

1. Interaction du SCE avec le système de récompense

i. Implication des récepteurs CB1

Il semblerait que l'interaction des drogues d'abus avec le SCE ait lieu majoritairement, voire exclusivement, au niveau des récepteurs CB1 (pour revue (Solinas et al., 2008b)). Ceci a été notamment mis en évidence par le fait que le THC, principe actif du cannabis et agoniste direct du récepteur CB1, induit des effets récompensants chez l'Homme et l'animal (Valjent and Maldonado, 2000b; Tanda and Goldberg, 2003; Justinova et al., 2005b). Néanmoins, quelques études récentes ont mis en évidence un rôle des récepteurs CB2 dans la dépendance aux drogues (Onaïvi et al, 2008 ; Xi et al, 2011 ; Gamaleddin et al, 2012a ; Gamaleddin et al, 2012b).

a- Les agonistes du récepteur CB1

Des agonistes des récepteurs CB1, comme WIN 55,212-2 et THC, facilitent les effets récompensants des drogues d'abus. Par exemple, l'administration de ces agonistes augmente les effets récompensants de l'héroïne (Solinas et al., 2005), de la nicotine (Valjent et al., 2002) et de l'alcool (Gallate et al., 1999). Au contraire, une étude réalisée chez le rat a montré que le WIN 55,212-2 diminuait l'auto-administration de cocaïne dans un protocole de ratio fixe (Fattore et al., 1999). Cependant, toutes ces études, activant directement les récepteurs CB1, n'est pas le meilleur moyen pour modéliser le rôle physiologique des ECs. En effet, les agonistes CB1 utilisés, dans ces études, ont des demi-vies plus longues que celles des cannabinoïdes endogènes (anandamide et 2AG) (Dinh et al., 2002). De plus, l'anandamide est un agoniste partiel des récepteurs CB1 (pour revue (McFarland and Barker, 2004)), alors que les agonistes synthétiques de ces récepteurs sont des agonistes sélectifs ayant une très grande affinité pour les récepteurs CB1 (Childers, 2006).

L'étude du rôle du SCE sur le système de récompense a été facilitée par la découverte d'antagonistes sélectifs pour les récepteurs CB1 comme le rimonabant (SR141716A) (Rinaldi-Carmona et al., 1994) et l'AM251 (Gatley et al., 1996), ainsi que par la production de souris KO pour ce récepteur (Ledent et al., 1999).

b- Les antagonistes du récepteur CB1

Les antagonistes des récepteurs CB1 diminuent les effets récompensants des drogues d'abus dans certaines conditions expérimentales. Par exemple, les effets récompensants des

opiacés sont diminués à la fois dans des protocoles d'auto-administration (Caille and Parsons, 2003) et dans la préférence de place conditionnée (Chaperon et al., 1998). Il a aussi été démontré que le rimonabant et l'AM251 diminuaient les effets récompensants de la METH dans un modèle d'auto-administration réalisé chez le rat (Vinklerova et al., 2002). La cocaïne constitue un cas à part. En général, les antagonistes des récepteurs CB1 n'altèrent pas l'auto-administration de cette drogue dans un protocole de fixed-ratio (De Vries et al., 2001; Filip et al., 2006), ni dans les procédures de préférence de place conditionnée (Chaperon et al., 1998). Par contre, il a été montré que l'AM251 est capable de diminuer l'auto-administration de cocaïne dans le cadre d'un protocole de progressive-ratio (Xi et al., 2006) et le rimonabant prévient la rechute induite par la cocaïne et le contexte (De Vries et al., 2001). Ces résultats suggèrent que les effets appétitifs de la cocaïne, et non ses effets récompensants, dépendraient de l'activation des récepteurs CB1. Enfin, il semblerait que le développement de la sensibilisation à la cocaïne ne soit pas sous le contrôle des récepteurs CB1 puisque des souris sauvages traitées avec le rimonabant (Lesscher et al., 2005) développent une sensibilisation comportementale suite à des injections répétées de cocaïne.

Les drogues d'abus ont la capacité d'augmenter le taux extracellulaire de DA dans le shell du NAc, un effet qui joue un rôle primordial dans les effets renforçants de ces drogues (pour revue (Di Chiara et al., 2004)). L'administration d'antagonistes des récepteurs CB1 bloque cette augmentation de DA induite par la nicotine et l'alcool (Cohen et al., 2002), mais pas par l'héroïne (Tanda et al., 1997; Caille and Parsons, 2003) ou la cocaïne (Caille and Parsons, 2006). Des augmentations transitoires de DA dans le NAc ont aussi été observées suite à l'administration de nicotine, d'alcool et de cocaïne (Cheer et al., 2007) et seraient impliquées dans le comportement de recherche de drogues (Phillips et al., 2003). De manière intéressante, une étude réalisée chez le rat a permis de montrer que l'administration du Rimonabant bloque ces augmentations (Cheer et al., 2007).

c- Les souris KO pour les récepteurs CB1

L'utilisation des souris KO pour le récepteur CB1 a permis de confirmer l'implication de ce récepteur dans les effets récompensants des drogues d'abus. En effet, ces souris ne

développent pas de préférence de place associée à la morphine (Martin et al., 2000) et ne s'autoadministrent pas cette drogue (Ledent et al., 1999; Cossu et al., 2001). Par contre, la préférence de place associée à la cocaïne n'est pas modifiée chez ces souris et elles ne développent pas de sensibilisation suite à des injections répétées de cocaïne (Martin et al., 2000). Par ailleurs, dans un protocole d'auto-administration à ratio fixe, les souris KO pour le récepteur CB1 s'autoadministrent moins la cocaïne quand elles sont mobiles (Soria et al., 2005) que quand elles sont immobilisées (Cossu et al., 2001).

ii. Implication des récepteurs CB2

Peu d'études ont permis de mettre en évidence l'implication des récepteurs CB2 dans l'addiction aux drogues. Onaïvi et collaborateurs ont démontré, par RT-PCR, qu'une administration chronique de cocaïne augmente l'expression du récepteur CB2, alors que l'alcool la diminue (Onaïvi et al, 2008). En 2011, Xi et collaborateurs ont montré que l'activation des récepteurs CB2 module les effets de la cocaïne. En effet, ils ont prouvé que l'administration systémique du JWH133 ou du GW405833, des agonistes sélectifs du récepteur CB2, inhibe l'auto-administration de la cocaïne chez des souris sauvages et des souris KO pour le récepteur CB1, mais pas chez des souris KO pour le récepteur CB2 ou prétraitée avec l'antagoniste AM630 (Xi et al, 2011). Dans cette même étude, ils ont aussi montré que, chez des souris sauvages, l'administration du JWH133 intra-NAc atténue l'auto-administration de cocaïne et diminue la libération de DA induite par cette drogue, des effets bloqués par un prétraitement avec l'AM630 (Xi et al, 2011). Ces résultats indiquent que l'effet inhibiteur du JWH133 passerait par une activation des récepteurs CB2, exprimés dans le NAc, qui inhibe la libération de DA, bloquant ainsi les effets récompensants et stimulateurs de la cocaïne. Par ailleurs, contrairement à ce qui est observé pour la cocaïne, Gamaleddin et collaborateurs ont montré que l'activation des récepteurs CB2 n'affecte ni la prise, ni le comportement de recherche de nicotine chez le rat (Gamaleddin et al, 2012a ; Gamaleddin et al, 2012b).

iii. Effets des ECs sur le système de récompense

L'anandamide et son analogue stable, la methanandamide, ont la propriété d'être autoadministrés par les primates non humains (Justinova et al., 2005a) et de renforcer l'auto-administration de METH chez les rats (Vinklerova et al., 2002). Ils induisent une augmentation des taux extracellulaires de DA dans le shell du NAc (Solinas et al., 2006), un effet qui semble être médié par les récepteurs CB1 et est potentialisé par l'inhibition de l'enzyme de dégradation de l'anandamide (FAAH) et non par l'inhibition de son transport (AM404) (Solinas et al., 2006; Solinas et al., 2007). Etant donné que l'anandamide est rapidement dégradé, le meilleur moyen d'étudier sa contribution aux processus de récompense est d'inhiber l'enzyme responsable de sa dégradation, la FAAH, à l'aide d'inhibiteurs comme l'URB597 (Kathuria et al., 2003) ou d'utiliser des souris KO pour cette enzyme (Cravatt et al., 2001). Ces manipulations ont notamment permis de démontrer l'implication de l'anandanmide dans la récompense induite par l'éthanol (Blednov et al., 2007). En effet, des souris ayant reçu l'URB597 et des souris KO pour la FAAH présentent une augmentation de la préférence à l'éthanol (Blednov et al., 2007), ce qui n'est pas le cas avec l'héroïne (Solinas et al., 2005). D'un autre côté, très peu d'études ont rapporté des effets comportementaux associés à l'action du 2-AG au niveau du système de récompense. Dans une étude publiée en 2002, Kirkham et collaborateurs ont trouvé que, quand il est injecté directement dans le Shell du NAc, le 2-AG est capable d'augmenter la prise de nourriture (Kirkham et al., 2002). Enfin, il est intéressant de noter que les souris KO pour la FAAH présentent un léger phénotype antidépresseur (Naidu et al., 2007) en accord avec le rôle de l'anandamide dans la régulation de l'humeur (Kathuria et al., 2003; Gobbi et al., 2005) *(cf. D-SCE et systèmes de stress)*.

2. Effets des drogues d'abus sur le SCE

Les études de microdialyse, une technique qui permet d'étudier *in vivo*, et de façon continue, le milieu extracellulaire cérébral, ont permis de mieux comprendre l'effet des drogues d'abus sur la libération de neurotransmetteurs dans le cerveau. Dans le cas des ECs

ceci est plus compliqué, et rares sont les études ayant employé la technique de microdialyse pour mesurer les taux extracellulaires d'ECs dans le cerveau. En effet, dans une étude combinant la microdialyse *in vivo* et l'auto-administration, Caille et collaborateurs ont démontré que l'auto-administration d'héroïne augmentait le taux d'anandamide dans le NAc alors que l'auto-administration de cocaïne ou d'éthanol ne le modifie pas (Caille et al., 2007). D'un autre côté, différentes études ont permis de mettre en évidence une diminution du taux d'anandamide dans différentes régions cérébrales en fonction de la drogue administrée. Ainsi, une administration chronique de THC (Di Marzo et al., 2000) ou de nicotine (Gonzalez et al., 2002) réduit le taux d'anandamide dans le striatum. Au contraire, l'administration chronique d'éthanol diminue le niveau d'anandamide dans le mésencéphale et non dans le striatum (Gonzalez et al., 2002). Enfin, l'administration chronique de cocaïne et de morphine n'altère pas les concentrations d'anandamide dans ces deux régions (Gonzalez et al., 2002 ; Vigano et al., 2003). L'administration chronique des drogues d'abus modifie aussi le taux du 2-AG dans des structures impliquées dans la récompense. Par exemple, il a été démontré que le THC (Di Marzo et al., 2000) et la morphine (Vigano et al., 2003) diminuent le taux du 2-AG dans le striatum, alors que la cocaïne et la nicotine ne le modifie pas (Gonzalez et al., 2002).

I- SCE et systèmes de stress

1. Régulation des émotions par le SCE

Plusieurs faits permettent de suggérer l'implication du SCE dans la régulation de la réactivité émotionnelle. Premièrement, les récepteurs CB1 sont exprimés, à des concentrations élevées, dans des structures cérébrales telles que les structures limbiques impliquées dans le contrôle de l'humeur et des émotions (Herkenham et al., 1991; Freund et al., 2003). Deuxièmement, la consommation de cannabis chez l'Homme induit une amélioration de l'humeur, et réduit les symptômes anxieux et dépressifs (Green et al., 2003). Troisièmement, des modifications du SCE ont été découvertes dans plusieurs maladies

neuropsychiatriques incluant des troubles de l'humeur, comme la maladie d'Alzheimer (van der Stelt et al., 2006), l'addiction aux drogues (Gonzalez et al., 2002) et la dépression majeure (Hill et al, 2008a). Enfin, la modulation de la transmission cannabinoïde, grâce à des outils pharmacologiques et génétiques, a permis de mettre en évidence un rôle des composants du SCE dans la régulation des comportements anxieux et dépressifs.

i. Les récepteurs cannabinoïdes

L'implication du récepteur CB1 dans le contrôle des comportements anxieux a été mise en évidence grâce aux invalidations génétiques et pharmacologiques de ce récepteur. En effet, des souris KO pour le récepteur CB1 présente un comportement anxieux basal plus important que les souris sauvages dans les modèles : (1) d'interaction sociale (Uriguen et al., 2004) ; (2) de la boîte « lumière/obscurité » (Martin et al., 2002; Uriguen et al., 2004) ; et (3) le labyrinthe en croix surélevé (Uriguen et al., 2004). Un pattern de modifications comportementales similaire est observé dans la dépression : l'invalidation génétique des récepteurs CB1 induit un phénotype dépressif chez les rongeurs (Patel et al., 2005) avec, notamment, une anhédonie et une augmentation de l'immobilité dans le test de la nage forcée (Martin et al., 2002; Steiner et al., 2008). Cependant, l'application d'antagonistes des récepteurs CB1 réduit ces comportements dépressifs (Griebel et al., 2005). Par ailleurs, il a été démontré que les récepteurs CB1 sont impliqués dans l'extinction des mémoires aversives via un effet inhibiteur au niveau de l'amygdale. En effet, en inhibant pharmacologiquement (SR141716A) ou génétiquement (souris KO) le récepteur CB1, Marsicano et collaborateurs ont démontré que ce récepteur était indispensable à l'extinction des mémoires aversives via une inhibition sélective des courants GABA-dépendants dans l'amygdale basolatérale (Marsicano et al., 2002).

ii. Les ECs

Des études menées chez les rongeurs ont démontré que l'augmentation des taux extracellulaires d'ECs, par inhibition de leur dégradation, aurait un effet anxiolytique. Par exemple, l'administration d'URB597, un inhibiteur de l'activité de la FAAH, induit : (1) une augmentation du temps passé dans les bras ouverts d'un labyrinthe en croix surélevé chez le

rat (Kathuria et al., 2003), (2) une diminution du taux plasmatique de corticostérone chez des souris immobilisées (Patel et al., 2004), (3) une diminution du développement de l'anhédonie chez des souris ayant subi des épisodes répétés d'immobilisation (Rademacher and Hillard, 2007) ainsi que (4) une normalisation de la prise de sucrose chez des rats ayant subi un stress chronique (Bortolato et al., 2007). De même, des souris traitées avec le JZL184, un inhibiteur de la MGL, passent plus de temps dans les bras ouverts du labyrinthe en croix surélevé que des souris non traitées (Busquets-Garcia et al., 2011). En invalidant génétiquement l'un des 2 récepteurs cannabinoïdes, Busquets-Garcia et collaborateurs ont pu démontrer que l'effet anxiolytique de l'anandamide était dépendant du récepteur CB1 tandis que celui induit par le 2-AG serait dépendant des récepteurs CB2 (Busquets-Garcia et al., 2011) . Il est intéressant de noter que la modulation indirecte du SCE semble être plus efficace que l'application d'agonistes directs des récepteurs. En particulier, l'inhibition de la FAAH qui n'induit pas d'hyperthermie, ni de catalépsie, ni d'hyperphagie, trois symptômes induits par une intoxication aux cannabinoïdes chez le rongeur (Kathuria et al., 2003).

Au niveau de l'axe HPA, il semblerait que, face à un facteur stressant, les ECs exercent un contrôle négatif sur l'activation de cet axe (Patel et al., 2004). Dans des conditions basales, les ECs du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (PVN) inhibent les afférences excitatrices, qui innervent l'axe HPA (Di et al., 2003; Patel et al., 2004). Leur diminution rapide suite à une exposition au stress induit une augmentation de la libération de CRF dans la veine porte et , par conséquent, l'augmentation de la production d'ACTH par l'hypophyse antérieure et de corticostérone par les glandes surrénales (Patel et al., 2004). Le dysfonctionnement du signal endocannabinoïde ne se limite pas à l'axe HPA mais peut s'étendre pour atteindre d'autres régions impliquées dans le stress comme l'hippocampe où il a été démontré une diminution de l'expression des récepteurs CB1 ainsi que du taux de 2-AG suite à un stress chronique imprédictible (Hill et al., 2005b).

2. Régulation du SCE par le stress

L'exposition à des évènements stressants induit, à son tour, des modifications du SCE dans différentes régions cérébrales. Néanmoins, les résultats varient selon les études et

selon les structures étudiées. Par exemple, dans le cas d'un stress chronique imprédictible, Hill et collaborateurs ont montré une diminution du taux d'anandamide dans le striatum ventral (Hill et al., 2008b), contrairement à une autre étude selon laquelle le taux d'anandamide ne change pas (Bortolato et al., 2007). De plus, des études réalisées chez la souris ont montré qu'un stress aigu ne modifie pas le taux d'ECs dans le striatum ventral (Rademacher et al., 2008), mais le réduit dans d'autres structures cérébrales comme l'amygdale et le CPF (Patel et al., 2004; Rademacher et al., 2008). Par ailleurs, Rademacher et collaborateurs rapportent qu'une exposition à un stress répété n'altère pas la fonction des CB1 dans le striatum ventral (Rademacher et al., 2008), tandis qu'une exposition à un stress chronique imprédictible la réduit (Hill et al, 2008b). Enfin, dans une étude publiée en 2008, Rossi et collaborateurs ont démontré que des souris exposées à une agression d'un congénère présentent un réarrangement des récepteurs CB1, exprimés au niveau du striatum dorsal, ainsi qu'un changement de la sensibilité des synapses GABAergiques à la stimulation induite par les CB1 (Rossi et al., 2008) ; un effet absent au niveau des synapses glutamatergiques (Rossi et al., 2008).

J- Rôle neuroprotecteur du SCE

Le SCE a émergé dans les dernières années comme neuroprotecteur dans des modèles de maladies neurodégénératives, telle que la maladie de Parkinson (Garcia-Arencibia et al., 2007). Plusieurs études ont démontré que les ECs présentent des effets neurotrophiques lors de lésions cérébrales comme l'ischémie (Melis et al., 2006). En se fixant aux récepteurs cannabinoïdes, les ECs modulent les fonctions cellulaires neuronales, gliales et endothéliales induisant un effet neuromodulateur (pour revue (Schlicker and Kathmann, 2001)), anti-excitotoxique (Marsicano et al, 2003), anti-inflammatoire (pour revue (Cabral et al., 2008)) et vasodilatateur (Parmentier-Batteur et al., 2002). Dans ce qui suit, je présenterai, dans un premier temps, des exemples de neuroprotection induite par le SCE dans le cadre de lésions cérébrales et de maladies neurodégénératives. Dans un deuxième temps, je détaillerai trois des mécanismes majeurs modulés par le SCE et impliqués dans la neuroprotection qu'il procure : (1) la modulation des neurotransmissions, (2) la modulation du système immunitaire, et (3) son rôle dans la survie neuronale.

1. SCE et atteintes cérébrales

Dans une étude récente, Melis et collaborateurs ont cherché à déterminer le rôle du SCE dans le dysfonctionnement dopaminergique induit dans l'ATV suite à une ischémie cérébrale (Melis et al., 2006). A l'aide d'une série de manipulations *in vivo* et *in vitro*, ils ont mis en évidence que (1) l'ischémie cérébrale stimule la libération du 2-AG, mais pas de l'anandamide ; (2) le 2-AG produit active les récepteurs CB1, induisant ainsi (3) une réduction de la libération excessive de glutamate induite par l'ischémie (Melis et al., 2006).

De plus, il a été montré que le taux des différents composants du SCE, notamment celui du récepteur CB1, est altéré de manière significative dans des désordres des ganglions de la base. Par exemple, une diminution du taux des récepteurs CB1 a été observée chez des patients atteints de la maladie de Huntington (Glass et al., 2000), ainsi que dans des phases précoces du développement de la maladie de Parkinson (Garcia-Arencibia et al., 2009). Cependant, dans les phases plus avancées de la maladie de Parkinson, une augmentation du taux de CB1 a été décrite à la fois chez l'Homme et chez le primate non humain dans un modèle de lésion induite par la MPTP (Lastres-Becker et al., 2001). Ces résultats ont poussé les chercheurs à explorer l'implication du SCE dans le traitement de maladies neurodégénératives caractérisées par un dysfonctionnement moteur (pour revue (Fernandez-Ruiz, 2009)). Dans le cadre de la maladie de Parkinson, Lastres-Becker et collaborateurs ont démontré un effet neuroprotecteur de la stimulation des récepteurs cannabinoïdes (Lastres-Becker et al., 2005). En effet, l'administration *in vivo* de cannabinoïdes exogènes (THC et cannabidiol), ainsi que l'application *in vitro* d'un agoniste de ces récepteurs (HU-210), diminuent la déplétion dopaminergique et les déficits de TH induits par la 6-OHDA dans le striatum de rats (Lastres-Becker et al., 2005). Ils ont ensuite utilisé des produits pharmacologiques plus sélectifs pour les différents composants du SCE afin de mieux caractériser les mécanismes cellulaires mis en œuvre dans cette neuroprotection. Ainsi, ils ont pu déterminer que cet effet neuroprotecteur est dépendant des récepteurs CB2 et non CB1 (Garcia-Arencibia et al., 2007).

2. Mécanismes potentiellement impliqués dans la neuroprotection induite par le SCE

i. SCE et modulation des neurotransmissions

L'inhibition de la libération de neurotransmetteurs est l'une des conséquences fonctionnelles induites par l'activation des récepteurs CB1 (pour revue (Schlicker and Kathmann, 2001)). En effet, les ECs forment un mécanisme de contrôle rétrograde *(cf. B-2-v. Les ECs : des messagers rétrogrades)* permettant la régulation de la libération d'autres neurotransmetteurs. La libération d'ECs active les récepteurs CB1 exprimés par les neurones présynaptiques, inhibant ainsi les afférences glutamatergique et GABAergique (Figure 26) (pour revue (Piomelli, 2003)) au niveau de différentes régions cérébrales comme l'hippocampe (Wilson and Nicoll, 2001), l'amygdale (Azad et al., 2003), et le striatum (Gerdeman and Lovinger, 2001). Il a été aussi démontré que la libération d'Ach peut être réduite par les cannabinoïdes et augmentée par l'inactivation des récepteurs CB1 (Schlicker and Kathmann, 2001), modulant ainsi les capacités d'apprentissage et de mémoire. Les cannabinoïdes réduisent également la libération de la noradrénaline et la sérotonine (pour revue (Schlicker and Kathmann, 2001)).

Bien que les effets primaires des agonistes CB1 sur la neurotransmission semblent être une inhibition, ils peuvent parfois induire une augmentation de la libération de neurotransmetteurs. Par exemple, des études réalisées chez l'animal (French, 1997 ; Tanda et al., 1997 ; Solinas et al., 2006) ont permis de mettre en évidence que l'activation du récepteur CB1 engendre une libération de DA dans le NAc. Ainsi, l'injection d'anandamide, ainsi que l'inhibition de la dégradation de cet EC, par injection d'URB597, augmentent le taux de DA dans le shell du NAc (Solinas et al., 2006). Ce phénomène est CB1-dépendant, puisque des études de microdialyse ont montré une augmentation du taux de DA dans le NAc suite à l'administration d'antagonistes CB1 (Chen et al., 1991) et en particulier dans la partie du Shell (Tanda et al., 1997).

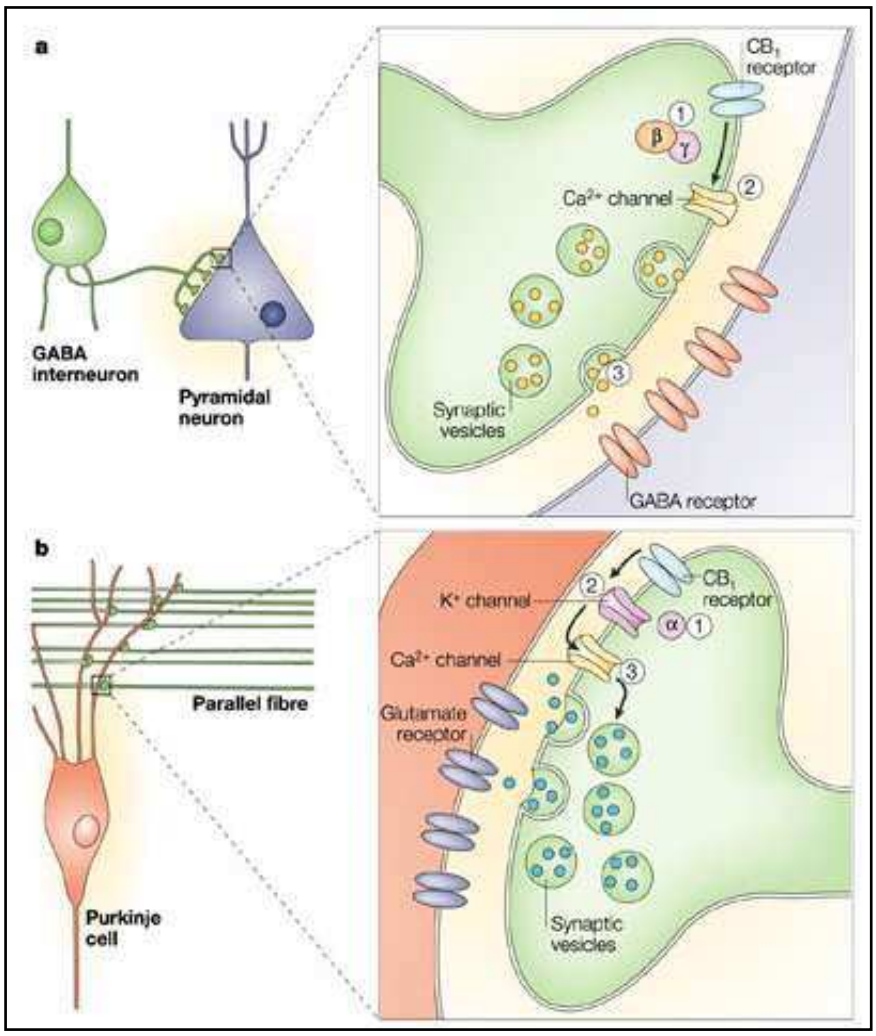


Figure 26. Régulation de l'activité des canaux ioniques présynaptiques par activation des récepteurs CB1. *(Piomelli, 2003)*

a- Synapse GABAergique: l'activation des récepteurs CB1 déclenche une série d'évènements intracellulaires incluant (1) l'activation de sous-unités de protéines G, (2) fermeture des canaux calciques voltage-dépendants et (3) inhibition de la libération de GABA.

b- Synapse glutamatergique : l'activation des récepteurs CB1 déclenche (1) l'activation des sous-unités de protéines G, (2) induisant l'ouverture de canaux potassiques. La membrane est alors hyperpolarisée, ce qui provoque (3) la diminution de l'entrée de calcium et donc l'inhibition de la libération de glutamate.

ii. SCE et modulation du système immunitaire

Les cannabinoïdes influencent la fonction immunitaire dans le SNC. En effet, il a été montré que l'administration de cannabinoïdes atténuait le développement de l'Encéphalomyélite Autoimmune Expérimentale, un modèle animal de la sclérose en plaques (Lyman et al., 1989) et présentait des propriétés anti-inflammatoires dans des modèles animaux d'Alzheimer (Esposito et al., 2007) et d'ischémie (Hayakawa et al., 2008). Des données d'invalidation génétique des récepteurs cannabinoïdes confirment ces résultats (Parmentier-Batteur et al., 2002). Par ailleurs, de nombreuses études ont décrit une régulation de l'expression des composants du SCE lors de la réponse immunitaire. En effet, l'application de lipopolysaccharide bactérien stimule la production d'ECs par les cellules immunitaires (Di Marzo et al., 1999; Maccarrone et al., 2000), inhibe l'expression de la FAAH (Maccarrone et al., 2001), et module l'expression des récepteurs cannabinoïdes CB1 et CB2 (Munro et al., 1993; Gardner et al., 2002).

Etant donnée sa forte expression dans les cellules immunitaires (Carlisle et al., 2002; Klegeris et al., 2003), il est clairement établi que le récepteur CB2 joue un rôle important dans la régulation de la réponse inflammatoire. En effet, il a été montré que le taux d'ARNm du récepteur CB2 est modulé différemment, selon l'état d'activation des cellules immunitaires : les récepteurs CB2 ne sont pas détectés dans les cellules au repos, ont un taux d'expression élevé dans les cellules en migration et une expression moins importante dans les cellules entièrement activées (Carlisle et al., 2002 ; Carrier et al., 2004 ; Maresz et al., 2005 ; Cabral et al., 2008). Cette augmentation de CB2 est indispensable pour la phase de migration puisque l'application d'agonistes du récepteur CB2 bloque ce processus, tandis que des agonistes du récepteur CB1 n'ont pas d'effet sur la migration (Raborn et al., 2008).

Le SCE module également la production de cytokines. Plusieurs études suggèrent que, lors d'une réponse immunitaire, le SCE induit une diminution de production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNFα (Roche et al., 2008) et une augmentation de production de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-4 (Yuan et al., 2002) et l'IL-10 (Smith et al., 2000).

iii. Effets opposés sur la survie/mort neuronale

Au niveau cellulaire, le THC a été démontré comme exerçant des effets toxiques sur des cultures de neurones hippocampiques (Chan et al., 1998) et corticaux (Campbell, 2001). De même, l'anandamide a été montré comme induisant l'apoptose des lymphocytes (Schwarz et al., 1994). Plusieurs mécanismes sous-tendent cette toxicité. En effet, les cannabinoïdes induisent (1) la production d'espèces réactives oxygénées (Chan et al., 1998), (2) l'activation de la caspase-3 résultant en une fragmentation de l'ADN et déclenchant l'apoptose (Campbell, 2001; Downer et al., 2001), (3) l'accumulation de céramides (Galve-Roperh et al, 2000) et (4) l'activation de la JNK (Downer et al., 2003; Sarker et al., 2003). Les effets toxiques du THC passeraient par les récepteurs CB1 puisque le blocage pharmacologique de ces récepteurs bloque la toxicité induite par le THC (Chan et al., 1998; Campbell, 2001). L'activation du récepteur CB1 joue un rôle primordial dans la mort neuronale induite par les cannabinoïdes (Downer et al., 2001). Il a été démontré que les récepteurs CB1 sont couplés à plusieurs voies de transduction *(cf. II.1.c Signalisation des récepteurs CB1 et CB2)* dont la voie des MAP kinases (Rueda et al., 2000). Parmi les kinases ainsi activées se trouve la kinase JNK (Downer et al., 2003), dont le rôle est de convertir les stimuli extracellulaires en signaux intracellulaires qui, à leur tour, contrôlent l'expression de gènes essentiels à la survie et à la mort neuronale (Marshall, 1995).

Ainsi donc, la neuroprotection que procure le SCE passe par la modulation de divers processus (ex. modulation de l'activation microgliale, modulation des systèmes de neurotransmission glutamatergique et dopaminergique…) qui interviennent dans la toxicité induite par la METH *(cf. Chapitre 1 de cette thèse)*. Au vu de ces données, nous avons voulu regarder si, en stimulant le SCE, on peut prévenir la neurotoxicité induite par la METH chez la souris. Ces résultats font l'objet de l'article 3 présenté dans cette thèse.

Objectifs de la thèse

Les facteurs environnementaux positifs, comme l'exposition à un EE, ont été décrit comme protecteurs contre la mise en place de la dépendance, en particulier grâce aux travaux réalisés dans l'équipe ces dernières années. Cependant, les mécanismes permettant de comprendre cette influence environnementale ne sont pas encore bien caractérisés. Ainsi, l'un des objectifs de mon travail de thèse a consisté à caractériser l'implication potentielle du SCE dans l'action préventive de l'EE contre la dépendance à la cocaïne. Ces travaux ont été publiés dans ***l'article 1***, intitulé « **Early exposure to environmental enrichment alters the expression of genes of the endocannabinoid system** », dans lequel nous avons étudié si l'effet bénéfique de l'EE contre la dépendance aux drogues pouvait être médié par une régulation de l'expression de gènes codant pour des protéines du SCE.

Une autre question que nous nous sommes posée consistait à déterminer si l'effet protecteur procuré par l'EE contre l'addiction aux drogues était maintenu en cas d'arrêt de l'enrichissement environnemental. Dans ***l'article 2***, intitulé « **Loss of environmental enrichment increases vulnerability to cocaine addiction** », nous avons recherché si des souris élevées en SE ou en EE pendant une durée de 2 mois (du sevrage jusqu'à l'âge adulte), puis ayant subi un «switch» environnemental de 7, 30 ou 90 jours, étaient également sensibles aux propriétés renforçantes de la cocaïne. Les mécanismes responsables des effets de ce « switch » ont également été caractérisés.

Un autre objectif de mon travail de thèse a consisté à rechercher une nouvelle approche pour protéger contre cette neurotoxicité. Nous nous sommes intéressés au SCE, pour lequel des propriétés neuroprotectrices commencent à être décrites dans plusieurs conditions pathologiques. Dans ***l'article 3***, intitulé « **Modulation of the endocannabinoid system prevents methamphetamine-induced neurotoxicity in mice** », nous avons étudié si la stimulation pharmacologique du SCE permet de prévenir la perte des terminaisons dopaminergiques induite par la METH dans le striatum.

Résultats Expérimentaux

Article 1: Early exposure to environmental enrichment alters the expression of genes of the endocannabinoid system

El Rawas R., Thiriet N., **Nader J.**, Lardeux V., Jaber M., Solinas M.

Brain Research (2011) 1390, 80-9

Notre équipe a récemment démontré que l'exposition des rongeurs à un EE pendant la période d'adolescence modulait l'expression de plusieurs gènes dans le striatum (Thiriet et al, 2008) et protégeait les animaux contre les effets récompensants de la cocaïne (Solinas et al, 2009). Par ailleurs, il a été établi que le système cannabinoïde endogène (SCE) est un système neuromodulateur impliqué dans les propriétés récompensantes des drogues : (1) le THC, principe actif du cannabis et agoniste synthétique des récepteurs CB1, présente des effets récompensants et augmente la libération de DA dans le NAc (pour revue (Tanda et Goldberg, 2003)) ; (2) les récepteurs CB1 sont exprimés dans des régions du cerveau impliquées dans le système de récompense comme le NAc, l'ATV et le CPF (Herkenham et al, 1990) ; (3) les agonistes des récepteurs CB1 facilitent les effets récompensants des drogues tandis que les antagonistes de ces récepteurs diminuent ces effets (pour revue (Tanda et Goldberg, 2003)) ; et (4) les stimuli renforçants augmentent le taux de cannabinoïdes endogènes dans le cerveau (pour revue (Solinas et al, 2008b)).

En partant de ces observations, nous avons recherché si l'effet préventif induit par une exposition à l'EE est sous-tendu par une régulation de l'expression de gènes codant pour les différents éléments du SCE. Pour cela, des souris C57Bl/6J ont été élevées soit dans un EE, soit dans un SE pendant deux mois, depuis le sevrage et jusqu'à l'âge adulte. Grâce à la technique d'hybridation *in situ*, nous avons étudié l'expression du récepteur CB1 et des enzymes de dégradation des cannabinoïdes endogènes, la FAAH et la MGL, dans des régions impliquées dans l'addiction aux drogues telles que l'amygdale, le noyau accumbens et le cortex préfrontal. Nous avons observé que le taux d'ARNm du récepteur CB1 est augmenté dans l'amygdale basolatérale et l'hypothalamus, et est diminué dans l'amygdale

basomédiale, chez les souris élevées en EE. Un profil similaire a été observé pour la FAAH : l'EE augmente le taux d'ARNm dans l'hypothalamus et l'amygdale basolatérale, mais ne le modifie pas dans l'amygdale basomédiale. Par contre, aucune modification n'a été observée pour le gène codant pour la MGL. Ces modifications ont eu lieu dans des régions cérébrales impliquées dans la réponse au stress. Afin de vérifier si l'exposition à l'EE modifiait la réponse au stress, nous avons utilisé le test de l'hypophagie induite par la nouveauté (NSF) pour comparer le niveau d'anxiété des souris SE et EE. Nos résultats comportementaux ont montré une diminution de l'état anxieux chez les souris élevées en EE par rapport à celles élevées en SE. L'ensemble de ces résultats suggère donc que l'EE induit une diminution de l'état de stress, un effet qui serait lié à la modulation du SCE dans les régions impliquées dans la régulation de la réponse au stress, et serait impliqué dans la résistance à l'addiction observée chez ces individus.

BRAIN RESEARCH 1390 (2011) 80–89

available at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/brainres

BRAIN RESEARCH

Research Report

Early exposure to environmental enrichment alters the expression of genes of the endocannabinoid system

*Rana El Rawas, Nathalie Thiriet, Joëlle Nader, Virginie Lardeux, Mohamed Jaber, Marcello Solinas**

Institut de Physiologie et Biologie Cellulaires, University of Poitiers, CNRS, 1 rue Georges Bonnet, Poitiers, F-86022, France

ARTICLE INFO

Article history:
Accepted 9 March 2011
Available online 16 March 2011

Keywords:
Cannabinoid
Fatty acid amide hydrolase
Monoacylglycerol lipase
In situ hybridization
Drug addiction
Stress

ABSTRACT

Early environmental enrichment (EE) produces several changes in gene expression in the brain and confers protection against the behavioral, neurochemical and molecular effects of repeated administration of drugs of abuse. Because the endogenous cannabinoid system (ECS) is known to play an important role in the rewarding effects of drugs, we investigated whether the positive effects of early exposure to EE are associated with changes in the expression of genes encoding for proteins that belong to the ECS in C57 mice. Using in situ hybridization, we compared the expression of the cannabinoid receptor CB1, fatty acid amide hydrolase (FAAH) and monoacylglycerol lipase (MGL) enzymes in brain regions involved in drug addiction in mice reared in either EE or standard environments (SE) from weaning until adulthood. We found that EE increases CB1 mRNA levels in the hypothalamus and in the basolateral amygdala but decreased them in the basomedial amygdala. Similarly, we found that FAAH mRNA levels are higher in the hypothalamus and the basolateral amygdala of EE mice compared to SE mice, with no change in the basomedial amygdala. In contrast, MGL mRNA levels were not affected by EE in any of the areas analyzed. The regional selectivity of EE-induced changes may indicate that early exposure to EE induces changes in the ECS that could result in reduced responses to stress, as confirmed in EE mice in a novelty-induced suppression of feeding test, and, ultimately, in resistance to addiction.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Several studies have investigated the influences of environmental factors in determining sensitivity to the rewarding effects of drugs and vulnerability to develop addiction (Goeders, 2002; Kreek et al., 2005; Marinelli and Piazza, 2002; Sinha, 2001; Solinas et al., 2010). For example, it has been shown that negative environmental factors exacerbate addiction to drugs of abuse such as amphetamine, cocaine, and heroin (Goeders, 2002; Kreek et al., 2005; Marinelli and Piazza, 2002; Sinha, 2001). On the other hand, others and we have shown that positive environmental manipulations, such as housing animals in environmental enrichment (EE) during early stages of life reduces the rewarding effects of amphetamine (Bardo et al., 2001; Green et al., 2002), cocaine (Green et al., 2010; Solinas et al., 2009), and opiates (El Rawas et al., 2009; Xu et al., 2007) but not those of methamphetamine (Thiriet et al., 2010). In addition, we have reported that rearing

* *Corresponding author*. Fax: +33 0 5 49 454014.
E-mail address: marcello.solinas@univ-poitiers.fr (M. Solinas).

0006-8993/$ – see front matter © 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.brainres.2011.03.025

mice in EE produces changes in the expression of several genes in the striatum (Bezard et al., 2003; Solinas et al., 2009; Thiriet et al., 2008) that may underlie the reduced reactivity of striatal neurons to cocaine (Solinas et al., 2009).

The endogenous cannabinoid system (ECS) is a neuromodulatory system that is comprised of cannabinoid CB receptors, endogenous ligands for CB receptors among which the best characterized are anandamide and 2-arachidonoylglycerol (2-AG), a putative membrane transporter and enzymes involved in the synthesis and inactivation of the endogenous ligands (Di Marzo et al., 2004; Piomelli, 2003). Converging evidence suggests that the ECS is involved in brain reward processes and drug addiction (Solinas et al., 2007; Solinas et al., 2008): 1) cannabinoid CB1 receptors are localized in brain regions implicated in reward such as the mesolimbic dopaminergic system (Herkenham et al., 1990; Howlett et al., 2004; Marsicano and Lutz, 1999; Tsou et al., 1998a); 2) delta-9-tetrahydrocannabinol (THC), the main psychoactive constituent of marijuana, synthetic CB1 receptor agonists and the endocannabinoid anandamide produce rewarding effects and increase dopamine levels in the nucleus accumbens (Gardner, 2005; Justinova et al., 2005; Solinas et al., 2007; Tanda and Goldberg, 2003); 3) CB1 receptors agonists facilitate rewarding effects of drugs of abuse and CB1 receptor antagonists or genetic invalidation of this receptor reduce subjective, rewarding, discriminative effects of a variety of drugs of abuse and prevent relapse to drug-seeking behavior in monkeys, rodents and humans (Gardner, 2005; Justinova et al., 2005; Ledent et al., 1999; Solinas et al., 2007; Tanda and Goldberg, 2003); and 4) reinforcing stimuli alters brain levels of endogenous cannabinoids (Caille et al., 2007; Solinas et al., 2008). In addition, it has been recently demonstrated that the ECS plays a major role in regulating stress responses (Cota, 2008; Ganon-Elazar and Akirav, 2009; Hill et al., 2009; Hill et al., 2010; Patel et al., 2004; Steiner and Wotjak, 2008) and in fact, it appears to oppose the consequences of chronic stress (Gorzalka et al., 2008). Importantly, we have recently proposed that the beneficial effects of EE are, at least in part, secondary to its anti-stress effects (Solinas et al., 2010).

Given the role of the ECS in reward and stress processes and the fact that EE reduces rewarding effects of drugs of abuse, we investigated whether exposure to EE during early stages of life could result in differential regulation of genes encoding for members of the ECS. For this, we housed C57 mice in either EE

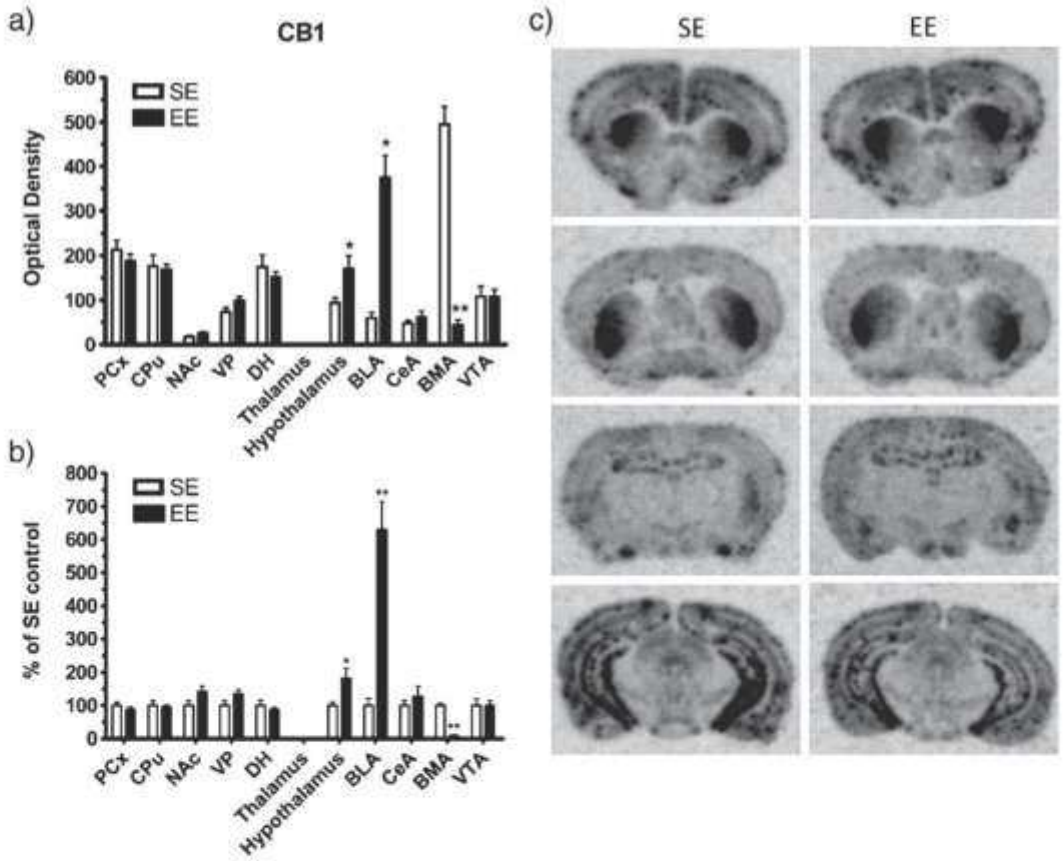


Fig. 1 – mRNA levels of CB1 receptor in mice reared in environmental enrichment (EE) or standard environments (SE). Densitometric analysis was used to quantify CB1 mRNA as a) units of optical density and b) percent over SE control level. c) Representative pictures showing the expression of CB1 mRNA at each bregma level analyzed. Results represent means ± SEM from 7–10 SE mice and 9–12 EE mice. Student's t-test: *, $p<0.05$; **, $p<0.01$ different from SE control. Abbreviations: PCx, prefrontal cortex; CPu, dorsal striatum; NAc, nucleus accumbens; DH, dorsal hippocampus; VP, ventral pallidum; BLA, basolateral amygdala; CeA, central amygdala; BMA, basomedial amygdala; VTA, ventral tegmental area.

or standard environments (SE) from weaning to adulthood and we used in situ hybridization techniques to assess the mRNA levels of CB1 receptors, fatty acid amide hydrolase (FAAH), the main enzyme involved in the degradation of anandamide (Cravatt and Lichtman, 2003; Di Marzo et al., 2004; Piomelli, 2003; Ueda et al., 2000), and monoacylglycerol lipase (MGL), the main enzyme involved in the degradation of 2-AG (Di Marzo et al., 2004; Dinh et al., 2002; Piomelli, 2003), in regions involved in drug addiction. Furthermore, in order to verify whether exposure to EE reduces stress responses in our experimental conditions, we compared stress responses of EE and SE mice in the novelty-induced suppression of feeding (NSF) test (Santarelli et al., 2003; Surget et al., 2008).

2. Results

2.1. *EE modifies the expression of CB1 receptor in the amygdala and the hypothalamus*

The distribution of mRNA levels of CB1 receptors in the brain regions analyzed was similar to what was previously described in control animals (Marsicano and Lutz, 1999; Tsou et al., 1998a). CB1 mRNA expression was absent in the thalamus, very low in the nucleus accumbens, the ventral tegmental area and the ventral pallidum (Fig. 1). On the other hand, the dorsal hippocampus, the amygdala, the dorsolateral caudate-putamen, the cortex and the hypothalamus showed moderate to high levels of CB1 mRNA. When comparing the effects of environments, the levels of CB1 receptor mRNA were significantly higher in the hypothalamus and the basolateral amygdala but significantly lower in the basomedial amygdala of EE mice compared to SE mice (Fig. 1). On the other hand, the expression of CB1 receptor mRNA did not differ between EE mice and SE mice in any of the other areas investigated (Fig. 1) [Student's *t*-test: BLA, DF = 15, *t*-value = 5.62, $p < 0.01$; BMA, environment effect: DF = 15, *t*-value = 11.82, $p < 0.0001$; hypothalamus, DF = 15, *t*-value = 2.24, $p < 0.05$].

2.2. *EE increases FAAH expression in the basolateral amygdala and the hypothalamus*

The distribution of the FAAH mRNA found in this study was comparable to that described in earlier papers (Thomas et al.,

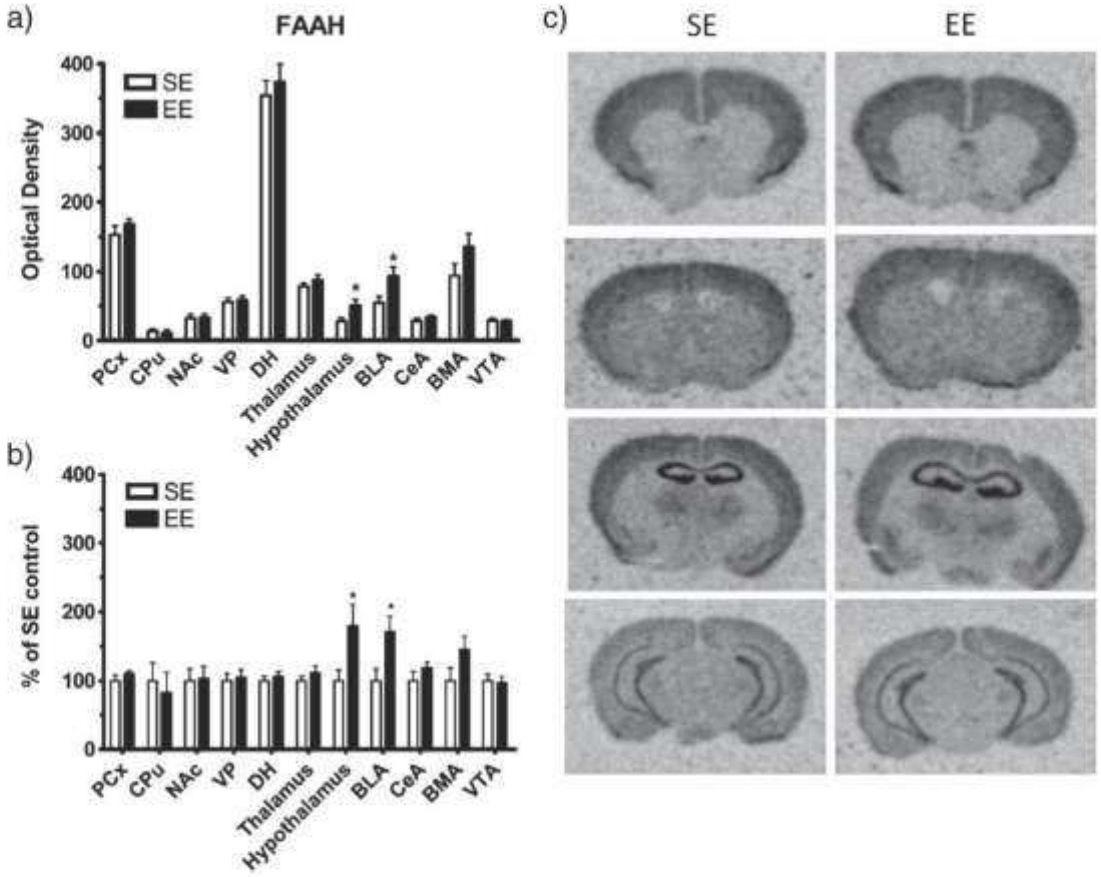


Fig. 2 – mRNA levels of FAAH enzymes in mice reared in environmental enrichment (EE) or standard environments (SE). Densitometric analysis was used to quantify the FAAH mRNA as a) units of optical density and b) percent over SE control level. c) Representative pictures showing the expression of FAAH mRNA at each bregma level analyzed. Results represent means ± SEM from 7–10 SE mice and 9–12 EE mice. Student's *t*-test: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ different from SE control. Abbreviations: PCx, prefrontal cortex; CPu, dorsal striatum; NAc, nucleus accumbens; DH, dorsal hippocampus; VP, ventral pallidum; BLA, basolateral amygdala; CeA, central amygdala; BMA, basomedial amygdala; VTA, ventral tegmental area.

1997; Tsou et al., 1998b), with high levels of expression in the dorsal hippocampus and the cortex, moderate levels in the amygdala, thalamus, hypothalamus and low levels in the basal ganglia and ventral tegmental area (Fig. 2). When comparing the effects of environments, levels of FAAH mRNA were significantly higher in the basolateral amygdala and the hypothalamus of EE mice compared with SE mice; no difference was found in the other areas analyzed (Fig. 2) [Student's *t*-test: BLA, DF=19, t-value=2.41, $p<0.01$; hypothalamus, DF=19, *t*-value=2.23, $p<0.05$].

2.3. *MGL expression is not altered by EE*

The distribution of the MGL mRNA found in this study was comparable to that described in earlier papers (Dinh et al., 2002). MGL mRNA was expressed mostly in the dorsal hippocampus, the cortex and the shell part of the nucleus accumbens (Fig. 3). Moderate to low expression was found in the caudate-putamen, the core part of the nucleus accumbens, the ventral pallidum, the thalamus, the amygdala, the hypothalamus and the ventral tegmental area. MGL mRNA expression did not differ between SE mice and EE mice in any of the brain regions analyzed (Fig. 3).

2.4. *EE mice are less anxious than SE mice*

In the NSF test, we found that, compared to SE mice, EE mice have similar latencies to sniff food but decreased latencies to actually start eating food (Fig. 4) [Student's *t*-test: eating time, DF=21, *t*-value=5.72, $p<0.0001$]. This indicates that exposure to EE reduces stress responses and anxiety.

3. Discussion

In this study, we investigated the impact of early exposure to EE on the ECS. Our main findings are that EE alters the mRNA levels of two members of the ECS, namely the cannabinoid CB1 receptor and FAAH enzyme. These changes were not widespread but rather limited to the amygdala and the hypothalamus, two regions that play key roles in stress responses. The present results appear to provide indirect support to our

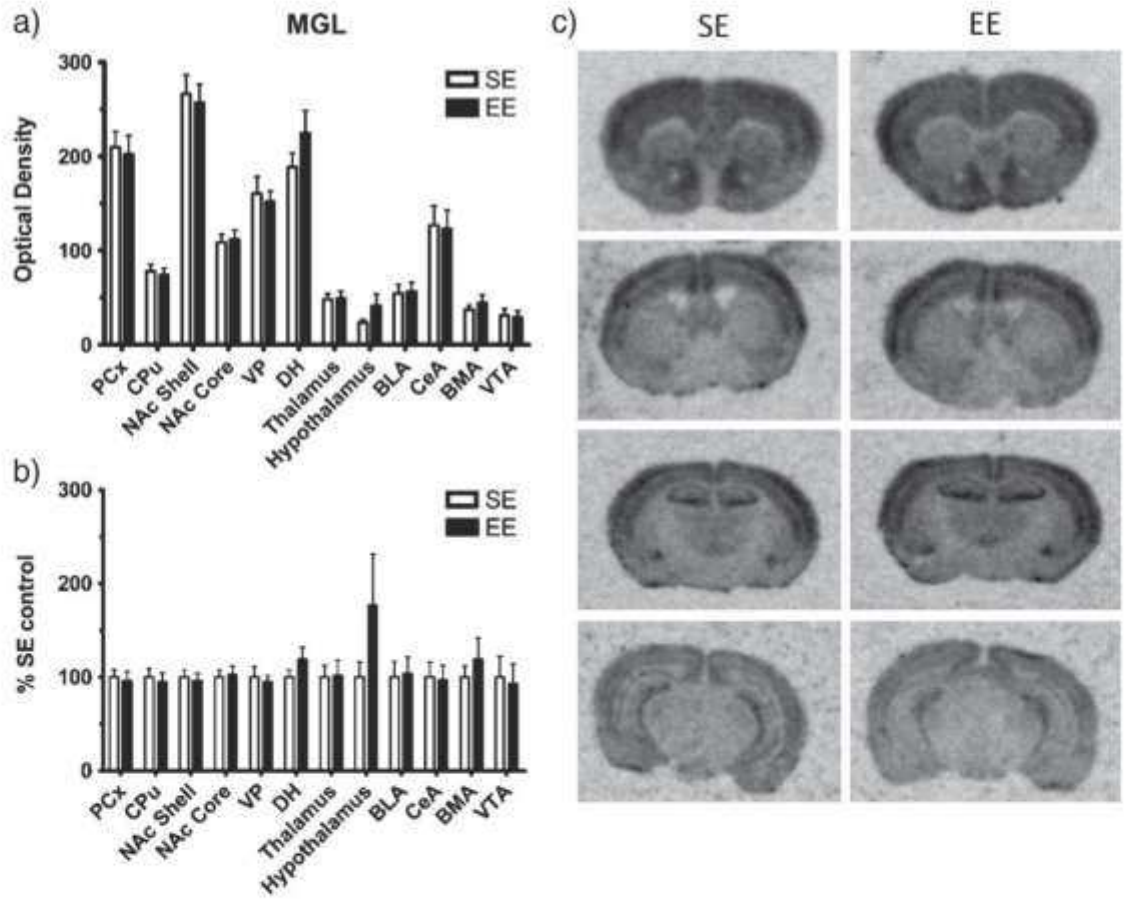


Fig. 3 – mRNA levels of MGL enzymes in mice reared in environmental enrichment (EE) or standard environments (SE). Densitometric analysis was used to quantify the MGL mRNA as a) units of optical density and b) percent over SE control level. c) Representative pictures showing the expression of MGL mRNA at each bregma level analyzed. Results represent means ± SEM from 7–10 SE mice and 9–12 EE mice. Student's *t*-test: *, $p<0.05$; **, $p<0.01$ different from SE control. Abbreviations: PCx, prefrontal cortex; CPu, dorsal striatum; NAc, nucleus accumbens; DH, dorsal hippocampus; VP, ventral pallidum; BLA, basolateral amygdala; CeA, central amygdala; BMA, basomedial amygdala; VTA, ventral tegmental area.

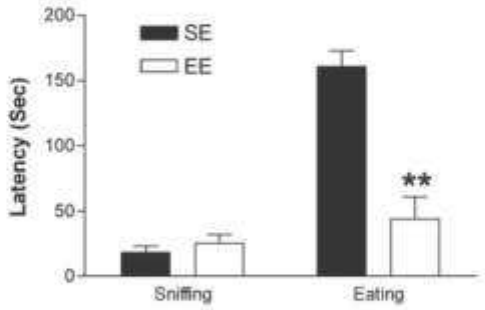


Fig. 4 – Stress responses in mice reared in environmental enrichment (EE) or standard environments (SE). The novelty-induced suppression of feeding test was used to investigate responses to stress. Latencies to sniff and to eat were used as measures of anxiety. Results represent means ±SEM from 12 SE mice and 11 EE mice. Student's *t*-test: **, $p<0.01$ different from SE control.

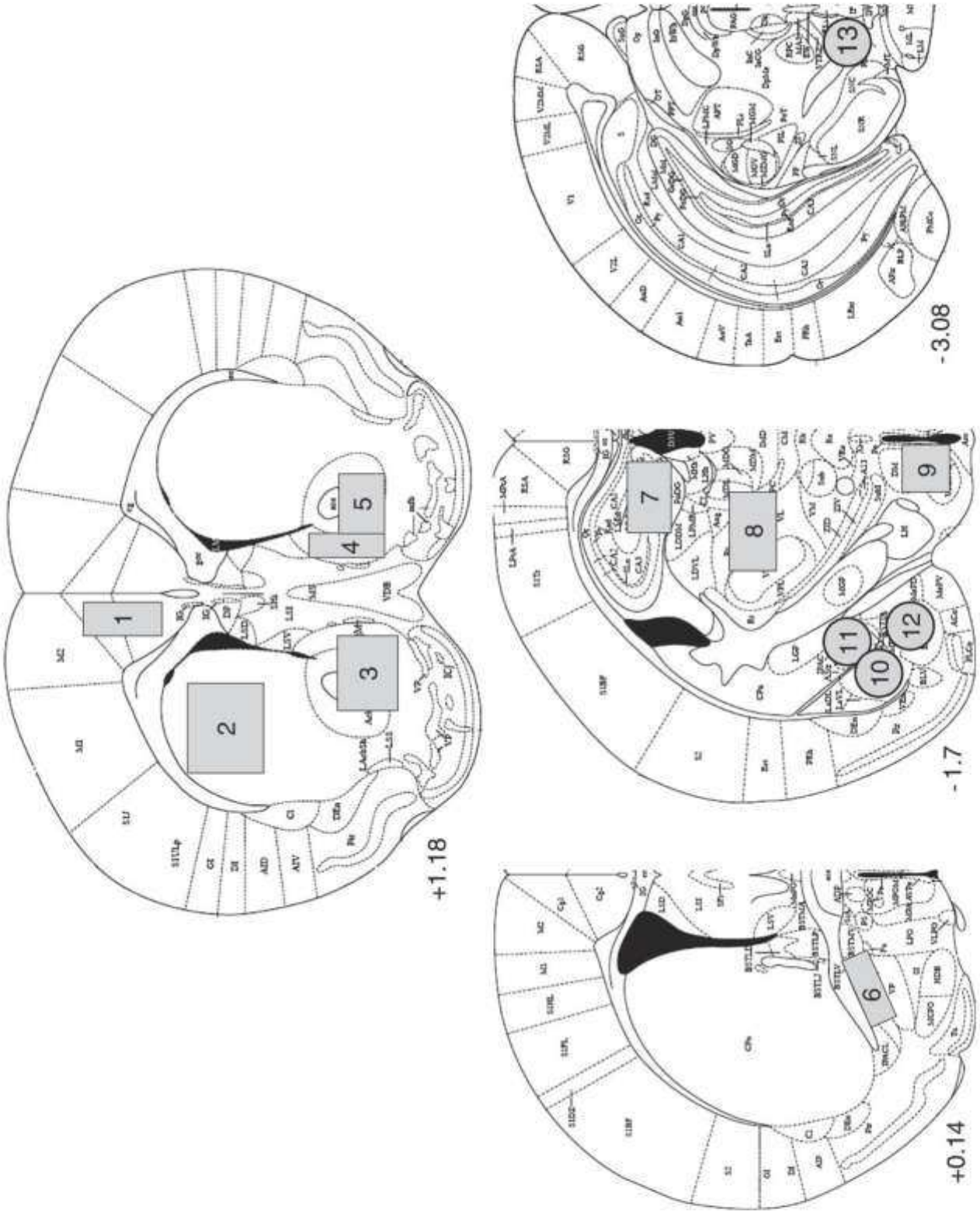
recent suggestion that anti-stress effects of EE play a major role in the ability of EE to decrease the vulnerability to addiction (Solinas et al., 2010).

We found that EE alters mRNA expression of CB1 and FAAH but not of MGL. FAAH enzymes are responsible for the degradation of anandamide (Cravatt and Lichtman, 2003; Di Marzo et al., 2004; Piomelli, 2003; Ueda et al., 2000) whereas MGL enzymes are responsible for the degradation of 2-AG (Di Marzo et al., 2004; Dinh et al., 2002; Piomelli, 2003). Basal levels of 2-AG in the brain are higher than those of anandamide (Caille et al., 2007; Stella et al., 1997; Sugiura et al., 1995) and several physiological or pharmacological manipulations produce bigger changes in anandamide than in 2-AG brain levels (Giuffrida et al., 1999; Valenti et al., 2004; Vigano et al., 2004). This had led to the hypothesis that whereas the primary role of anandamide is neurotransmission, 2-AG would be more involved in housekeeping roles that are necessary for basal cell functioning and survival (Piomelli, 2003). Although in this study, we did not measure anandamide and 2-AG levels, the lack of EE-induced changes in MGL mRNA brings indirect support to this hypothesis.

Early exposure to EE has several beneficial effects in rodents including improvements in memory and learning capabilities and in neurological and psychiatric diseases (Laviola et al., 2008; Nithianantharajah and Hannan, 2006; Solinas et al., 2010; van Praag et al., 2000). In the last years, we performed several studies in mice demonstrating powerful beneficial effects of EE on drug addiction (Solinas et al., 2010). For example, we found that both cocaine and heroin conditioned place preferences are reduced in mice reared in EE compared to SE mice (El Rawas et al., 2009; Solinas et al., 2009). In addition, EE mice showed reduced activating effects of cocaine and reduced expression of zif-268 in the shell of the nucleus accumbens in response to cocaine in a behavioral sensitization procedure (Solinas et al., 2009). These changes were paralleled by dramatic alterations in striatal gene expression and functioning (Bezard et al., 2003; Solinas et al., 2009; Thiriet et al., 2008). Conversely, the ECS is known to play a key role in the reinforcing effects of drugs of addiction (Solinas et al., 2007; Solinas et al., 2008) and regions of the meso-cortico dopaminergic pathway appear to mediate several of these effects (Caille et al., 2007; Solinas et al., 2006; Zangen et al., 2006). Based on these lines of evidence, we expected to detect EE-induced changes in the ECS in the prefrontal cortex, the striatum and the ventral tegmental area, but such changes were not found in the present study. Another brain area where both EE (Solinas et al., 2010; van Praag et al., 2000) and cannabinoid seem to act is the hippocampus (Howlett et al., 2004). However, significant alterations of the ECS were not found in any of these areas in EE mice. A previous study that used quantitative autoradiography found that EE increases CB1 receptor binding in the globus pallidum, the entopeduncular nucleus and the substantia nigra but not in the striatum and antagonizes the decreases in CB1 receptor binding associated with Huntington disease in each of these areas (Glass et al., 2004). However, direct comparison between receptor binding in this study and mRNA levels in ours is not straightforward because cannabinoid CB1 receptors are present both on synaptic terminals (Freund et al., 2003) and in somatodendritic locations (Kofalvi et al., 2005; Rodriguez et al., 2001).

Instead of meso-cortical-limbic or hippocampal areas, EE appeared to selectively alter gene expression of members of the ECS in the amygdala and the hypothalamus, two areas that play important roles in stress response (Hill and McEwen, 2009; McEwen, 2007). In addition, exposure to EE reduces responses to stress as demonstrated by decreases in locomotion in a novel environment, a response that is often considered a stress-related measure (Bezard et al., 2003), and decreases in latency to eat food in a novel environment in a novelty-induced suppression of feeding (present study). These findings support our recent proposal that one of the main mechanisms underlying the positive effects of EE on addiction is the inhibition of stress responses and the ability to boost antistress brain mechanisms (Solinas et al., 2010). Keeping in consideration this hypothesis, it should be noticed that chronic unpredictable stress was found to decrease the binding to CB1 receptors in the hypothalamus and the tissue levels of anandamide in the hypothalamus and the amygdala (Hill et al., 2008). Social isolation, another form of stress in rodents (Hall, 1998), has been shown to produce a decrease in CB1 receptors in the amygdala as measured by immunohistochemistry (Malone et al., 2008) but not by in situ hybridization (Robinson et al., 2010). In addition, no change was found at the

Fig. 5 – Schematic representation of the regions in which mRNAs for MGL, FAAH and CB1 were quantified by in situ hybridization. Bregma 1.18 mm: 1) prefrontal cortex, 2) dorsal striatum, 3) nucleus accumbens, 4) nucleus accumbens shell, 5) nucleus accumbens core; bregma 0.14 mm: 6) ventral pallidum bregma 1.7 mm: 7) the dorsal hippocampus, 8) thalamus, 9) hypothalamus, 10) basolateral amygdala, 11) central amygdala, 12) basomedial amygdala; bregma 3.08 mm: 13) ventral tegmental area. It should be noticed that it was possible to distinguish between the shell and core of the nucleus accumbens (areas 4 and 5) only for MGL probes whereas for CB1 and FAAH probes expression in the entire accumbens was measured (area 3).


1
2
3
4
5
+1.18
6
+0.14
7
8
9
10
11
12
-1.7
13
-3.08

mRNA level in the amygdala or the hypothalamus for CB1 receptors, FAAH or MGL but significant changes were found in cortical regions (Robinson et al., 2010). These results highlight the complexity of the effects of environmental conditions on gene expression in the brain and indicate that in some instances the modifications induced by EE and stress may not be mirror images.

Recently, the ECS has emerged as a key player in the regulation of the activity of the HPA axis (Cota, 2008; Ganon-Elazar and Akirav, 2009; Hill et al., 2009; Hill et al., 2010; Patel et al., 2004; Steiner and Wotjak, 2008). In fact, increases in endocannabinoid signaling can suppress stress-responsive system (Cota, 2008; Patel et al., 2004; Steiner and Wotjak, 2008). More precisely, it has been shown that the activation of CB1 receptor in the basolateral amygdala inhibits stress-induced corticosterone elevation (Ganon-Elazar and Akirav, 2009; Hill et al., 2009). Also, in the hypothalamus, a link between glucocorticoids and cannabinoids has been reported (Di et al., 2003; Tasker, 2006; Viveros et al., 2007). For example, negative feedback of stress responses is mediated by glucocorticoid-stimulated synthesis and release of endocannabinoids within the paraventricular nucleus (Di et al., 2003; Tasker, 2006; Viveros et al., 2007). Given that EE decreases stress-induced corticosterone levels and reduces animal stress (Belz et al., 2003; Benaroya-Milshtein et al., 2004; Laviola et al., 2004; Moncek et al., 2004; Morley-Fletcher et al., 2003; present study), the changes in CB1 receptor and FAAH mRNA expression in the basolateral amygdala and in the hypothalamus of EE mice reported here may participate to the reduced stress effects in EE. Consequently, as stress increases vulnerability to develop drug addiction (Goeders, 2002; Marinelli and Piazza, 2002), these EE-induced alteration in the ECS could ultimately be involved in the decreased vulnerability to develop drug addiction observed in EE animals (Carroll et al., 2009; Laviola et al., 2008; Solinas et al., 2010; Stairs and Bardo, 2009).

A few caveats for the interpretation of our study should be highlighted. First of all, in this study we measured only mRNA levels of CB1 receptors, FAAH and MGL and it is possible that some functional changes could not be detected. This is especially relevant because EE was provided chronically for 2 months and, therefore, some changes in the ECS may have occurred in the first days or weeks of EE and later, when they reached a steady-state level, they could have returned to basal levels, and thus, they could remain undetected. In addition, we did not measure functional changes that could have altered the affinity for the ligand/substrate or changes in coupling of CB1 receptors similar to those reported in previous studies (Rubino et al., 1998; Rubino et al., 2000a; Rubino et al., 2000b; Rubino et al., 2003). Also, the present study did not directly measure changes in brain levels of endocannabinoids that could also be altered by EE. However, the current techniques to detect endocannabinoid levels cannot be easily adapted to provide the regional selectivity that is necessary to dissect small brain regions in the mouse brain such as the basomedial and the basolateral amygdala that show opposite effects of EE on CB1 levels.

In conclusion, we found that exposure to EE during early stages of life induces alterations in the ECS in brain regions that play central roles in stress responses. These EE-induced changes may result in the modulation of levels of stress and anxiety and consequently in the reduction of the rewarding effects of drugs of abuse. Our results further support the hypothesis that the ECS is a promising target for the development of new medication to treat addiction (Solinas et al., 2007; Solinas et al., 2008) and other psychiatric diseases in which stress plays a major role (Di Marzo et al., 2004; Hill and Gorzalka, 2009; Hill and McEwen, 2009).

4. Experimental procedures

4.1. *Subjects*

C57Bl/6J mice were bred on-site assuring that parents were not siblings. Only males were used in the study. They were housed in a temperature-controlled environment on a 12-h light/12-h dark cycle with the lights on from 7:00 AM to 7:00 PM and had ad libitum access to food and water. All experimentations were conducted during the light period. Experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) for the care of laboratory animals.

4.2. *Housing environmental conditions*

After weaning (3 weeks of age), mice from different litters were randomly divided in two different housing environmental conditions, SE or EE, in groups of four (mice in the same cage were not siblings) for 2 months. SE consisted of common cage housing (25 cm × 20 cm × 15 cm). EE consisted of larger (60 cm × 38 cm × 20 cm) cages containing constantly a running wheel and a small house and four to five toys that were changed once a week with new toys of different shapes and colours.

4.3. *In situ hybridization*

Mice were killed between 10 AM and 2 PM. In situ hybridization experiments were performed on brains of EE ($n=12$) or SE ($n=10$) mice. Brains were removed, frozen in isopentane at −40 °C, and then stored at −80 °C. Coronal tissue sections (14 μm thick) were thaw-mounted onto SUPERFROST slides (VWR International, Fontenay sous Bois, France) and stored at −80 °C.

Plasmids containing CB1, MGL and FAAH probes were kindly provided by Dr. G. Marsicano (Inserm, Université Bordeaux II, France). The plasmids were amplified in competent bacteria then extracted using a Pure Yield plasmid Midiprep system protocol. Ten microgram of plasmids was linearized using restriction enzymes targeting restriction sites on both sides of the inserts in order to later synthesize sense and antisense riboprobes. The linearized plasmids were then purified by phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation. Antisense and sense cRNA probes were prepared by in vitro transcription from 1 μg of linearized plasmid in the presence of [^{35}S]-UTP (Promega, France). The sense riboprobes were used as control for the probes specificity.

The in situ hybridization procedure was performed as previously described (Thiriet et al., 2000; Thiriet et al., 2001).

Sections were delipidated, acetylated and prehybridized for 10 min at 60 °C in a solution containing formamide 50%/SSC 1× (150 mM NaC1 and 15 mM sodium citrate, pH 7). They were then dehydrated by immersion in a graded series of ethanol solutions and air-dried. The labelled probes were diluted at the concentration 25,000 cpm/μl in the hybridization buffer containing 50% formamide, 10% dextran sulfate, 4× SSC, 10 mM dithiothreitol. Thirty microliters of the probe solution were placed on the sections at 52 °C overnight. The sections were washed twice in 50% formamide, 1× SSC at 55 °C for 1 h. A treatment with RNAse A (0.006 U/ml), diluted in 10 mM Tris–HCl buffer (pH 8) containing 100 mM NaCl and 1 mM EDTA, was performed for 30 min at 37 °C. The slides were rinsed again, dehydrated, air dried and exposed for 7 days to a Storm Phosphorimager system for quantitative analysis using Image Quant software. Sections were taken at different distances from bregma to allow for the analysis of the optical densities for selected brain areas (Fig. 5): bregma 1.18 mm for caudate putamen (CPu), nucleus accumbens shell (NAcS), nucleus accumbens core (NAcC), prefrontal cortex (PCx); bregma 0.14 for ventral pallidum (VP); bregma—1.7 mm for dorsal hippocampus (DH), basolateral amygdala (BLA), basomedial amygdala (BMA), central amygdala (CeA), thalamus, hypothalamus; bregma—3.08 mm for ventral tegental area (VTA) (see Fig. 5). The optical densities were calculated by subtracting the background level determined as the optical density in the corpus collusum or the ventricle for each section. A total of two slides per animal (four sections per slide) were used and analyzed for each hybridization experiment. All experiments were done in duplicate.

The distribution of the hybridization signal in the nucleus accumbens varied depending on probe used. Whereas for the MGL probe we could differentiate between the shell and the core of the nucleus accumbens, with the FAAH and CB1 probes it was not possible to distinguish these two subregions (see Fig. 5 and Figs. 1c, 2c, 3c). Therefore, for these mRNAs the entire nucleus accumbens was quantified (see Fig. 5).

4.4. *Novelty-suppressed feeding test (NSF)*

The NSF is a test designed to induce a conflict between the rodent's innate fear of novel environments and the hunger induced by food-deprivation (Santarelli et al., 2003; Surget et al., 2008). The NSF is often used to measure stress responses and emotional states in rodents. In brief, food was removed from the cages the night before the test and, approximately 14 h later, mice were brought to the testing room 1 h before the test for habituation. The testing apparatus consisted of a home-made wooden box (33 cm × 33 cm × 30 cm) with a floor covered with 2-cm sawdust that was changed between trials. During testing, a single pellet of regular chow was placed on a white paper in the center of the box. Mice were placed in a corner of the box and latencies to sniff food and to begin eating were recorded for 3 min. Shorter latencies were interpreted as an index of reduction of stress responses and anxiety.

4.5. *Statistics*

All results are presented as group means ± SEM. Differences in mRNA levels or behavioral measures between SE and EE mice were assessed by unpaired two-tail Student's t-test. Differences were considered significant when $p<0.05$.

Acknowledgments

We thank G. Marsicano for generously providing plasmids containing CB1, MGL and FAAH probes. This work was supported by Centre National pour la Recherche Scientifique, University of Poitiers, Mission Interministérielle de la Lutte contre les Drogues et la Toxicomanie (MILDT-INSERM, 2006–2007 and MILDT-INSERM-INCA 2007–2009), Région Poitou Charentes. El Rawas R was a recipient of a CNRS PhD fellowship (BDI-PED, 2005–2008). Nader J is a recipient of a PhD fellowship from the French Ministry of Research.

REFERENCES

Bardo, M.T., Klebaur, J.E., Valone, J.M., Deaton, C., 2001. Environmental enrichment decreases intravenous self-administration of amphetamine in female and male rats. Psychopharmacol. (Berl) 155, 278–284.

Belz, E.E., Kennell, J.S., Czambel, R.K., Rubin, R.T., Rhodes, M.E., 2003. Environmental enrichment lowers stress-responsive hormones in singly housed male and female rats. Pharmacol. Biochem. Behav. 76, 481–486.

Benaroya-Milshtein, N., Hollander, N., Apter, A., Kukulansky, T., Raz, N., Wilf, A., Yaniv, I., Pick, C.G., 2004. Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. Eur. J. Neurosci. 20, 1341–1347.

Bezard, E., Dovero, S., Belin, D., Duconger, S., Jackson-Lewis, V., Przedborski, S., Piazza, P.V., Gross, C.E., Jaber, M., 2003. Enriched environment confers resistance to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and cocaine: involvement of dopamine transporter and trophic factors. J. Neurosci. 23, 10999–11007.

Caille, S., Alvarez-Jaimes, L., Polis, I., Stouffer, D.G., Parsons, L.H., 2007. Specific alterations of extracellular endocannabinoid levels in the nucleus accumbens by ethanol, heroin, and cocaine self-administration. J. Neurosci. 27, 3695–3702.

Carroll, M.E., Anker, J.J., Perry, J.L., 2009. Modeling risk factors for nicotine and other drug abuse in the preclinical laboratory. Drug Alcohol Depend. 104 (Suppl 1), S70–S78.

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

Cravatt, B.F., Lichtman, A.H., 2003. Fatty acid amide hydrolase: an emerging therapeutic target in the endocannabinoid system. Curr. Opin. Chem. Biol. 7, 469–475.

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

Di, S., Malcher-Lopes, R., Halmos, K.C., Tasker, J.G., 2003. Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. J. Neurosci. 23, 4850–4857.

Dinh, T.P., Carpenter, D., Leslie, F.M., Freund, T.F., Katona, I., Sensi, S.L., Kathuria, S., Piomelli, D., 2002. Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 99, 10819–10824.

El Rawas, R., Thiriet, N., Lardeux, V., Jaber, M., Solinas, M., 2009. Environmental enrichment decreases the rewarding but not the activating effects of heroin. Psychopharmacol. (Berl) 203, 561–570.

Freund, T.F., Katona, I., Piomelli, D., 2003. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. Physiol. Rev. 83, 1017–1066.
Ganon-Elazar, E., Akirav, I., 2009. Cannabinoid receptor activation in the basolateral amygdala blocks the effects of stress on the conditioning and extinction of inhibitory avoidance. J. Neurosci. 29, 11078–11088.
Gardner, E.L., 2005. Endocannabinoid signaling system and brain reward: emphasis on dopamine. Pharmacol. Biochem. Behav. 81, 263–284.
Giuffrida, A., Parsons, L.H., Kerr, T.M., Rodriguez de Fonseca, F., Navarro, M., Piomelli, D., 1999. Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. Nat. Neurosci. 2, 358–363.
Glass, M., van Dellen, A., Blakemore, C., Hannan, A.J., Faull, R.L., 2004. Delayed onset of Huntington's disease in mice in an enriched environment correlates with delayed loss of cannabinoid CB1 receptors. Neuroscience 123, 207–212.
Goeders, N.E., 2002. Stress and cocaine addiction. J. Pharmacol. Exp. Ther. 301, 785–789.
Gorzalka, B.B., Hill, M.N., Hillard, C.J., 2008. Regulation of endocannabinoid signaling by stress: implications for stress-related affective disorders. Neurosci. Biobehav. Rev. 32, 1152–1160.
Green, T.A., Gehrke, B.J., Bardo, M.T., 2002. Environmental enrichment decreases intravenous amphetamine self-administration in rats: dose-response functions for fixed- and progressive-ratio schedules. Psychopharmacol. (Berl) 162, 373–378.
Green, T.A., Alibhai, I.N., Roybal, C.N., Winstanley, C.A., Theobald, D.E., Birnbaum, S.G., Graham, A.R., Unterberg, S., Graham, D.L., Vialou, V., Bass, C.E., Terwilliger, E.F., Bardo, M.T., Nestler, E.J., 2010. Environmental enrichment produces a behavioral phenotype mediated by low cyclic adenosine monophosphate response element binding (CREB) activity in the nucleus accumbens. Biol. Psychiatry 67, 28–35.
Hall, F.S., 1998. Social deprivation of neonatal, adolescent, and adult rats has distinct neurochemical and behavioral consequences. Crit. Rev. Neurobiol. 12, 129–162.
Herkenham, M., Lynn, A.B., Little, M.D., Johnson, M.R., Melvin, L.S., de Costa, B.R., Rice, K.C., 1990. Cannabinoid receptor localization in brain. Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 87, 1932–1936.
Hill, M.N., Carrier, E.J., McLaughlin, R.J., Morrish, A.C., Meier, S.E., Hillard, C.J., Gorzalka, B.B., 2008. Regional alterations in the endocannabinoid system in an animal model of depression: effects of concurrent antidepressant treatment. J. Neurochem. 106, 2322–2336.
Hill, M.N., Gorzalka, B.B., 2009. The endocannabinoid system and the treatment of mood and anxiety disorders. CNS Neurol. Disord. Drug Targets 8, 451–458.
Hill, M.N., McEwen, B.S., 2009. Involvement of the endocannabinoid system in the neurobehavioural effects of stress and glucocorticoids. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.
Hill, M.N., McLaughlin, R.J., Morrish, A.C., Viau, V., Floresco, S.B., Hillard, C.J., Gorzalka, B.B., 2009. Suppression of amygdalar endocannabinoid signaling by stress contributes to activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Neuropsychopharmacology 34, 2733–2745.
Hill, M.N., Patel, S., Campolongo, P., Tasker, J.G., Wotjak, C.T., Bains, J.S., 2010. Functional interactions between stress and the endocannabinoid system: from synaptic signaling to behavioral output. J. Neurosci. 30, 14980–14986.
Howlett, A.C., Breivogel, C.S., Childers, S.R., Deadwyler, S.A., Hampson, R.E., Porrino, L.J., 2004. Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. Neuropharmacology 47 (Suppl 1), 345–358.
Justinova, Z., Goldberg, S.R., Heishman, S.J., Tanda, G., 2005. Self-administration of cannabinoids by experimental animals and human marijuana smokers. Pharmacol. Biochem. Behav. 81, 285–299.
Kofalvi, A., Rodrigues, R.J., Ledent, C., Mackie, K., Vizi, E.S., Cunha, R.A., Sperlagh, B., 2005. Involvement of cannabinoid receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rodent striatum: a combined immunochemical and pharmacological analysis. J. Neurosci. 25, 2874–2884.
Kreek, M.J., Nielsen, D.A., Butelman, E.R., LaForge, K.S., 2005. Genetic influences on impulsivity, risk taking, stress responsivity and vulnerability to drug abuse and addiction. Nat. Neurosci. 8, 1450–1457.
Laviola, G., Rea, M., Morley-Fletcher, S., Di Carlo, S., Bacosi, A., De Simone, R., Bertini, M., Pacifici, R., 2004. Beneficial effects of enriched environment on adolescent rats from stressed pregnancies. Eur. J. Neurosci. 20, 1655–1664.
Laviola, G., Hannan, A.J., Macri, S., Solinas, M., Jaber, M., 2008. Effects of enriched environment on animal models of neurodegenerative diseases and psychiatric disorders. Neurobiol. Dis. 31, 159–168.
Ledent, C., Valverde, O., Cossu, G., Petitet, F., Aubert, J.F., Beslot, F., Bohme, G.A., Imperato, A., Pedrazzini, T., Roques, B.P., Vassart, G., Fratta, W., Parmentier, M., 1999. Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. Science 283, 401–404.
Malone, D.T., Kearn, C.S., Chongue, L., Mackie, K., Taylor, D.A., 2008. Effect of social isolation on CB1 and D2 receptor and fatty acid amide hydrolase expression in rats. Neuroscience 152, 265–272.
Marinelli, M., Piazza, P.V., 2002. Interaction between glucocorticoid hormones, stress and psychostimulant drugs. Eur. J. Neurosci. 16, 387–394.
Marsicano, G., Lutz, B., 1999. Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. Eur. J. Neurosci. 11, 4213–4225.
McEwen, B.S., 2007. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. Physiol. Rev. 87, 873–904.
Moncek, F., Duncko, R., Johansson, B.B., Jezova, D., 2004. Effect of environmental enrichment on stress related systems in rats. J. Neuroendocrinol. 16, 423–431.
Morley-Fletcher, S., Rea, M., Maccari, S., Laviola, G., 2003. Environmental enrichment during adolescence reverses the effects of prenatal stress on play behaviour and HPA axis reactivity in rats. Eur. J. Neurosci. 18, 3367–3374.
Nithianantharajah, J., Hannan, A.J., 2006. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. Nat. Rev. Neurosci. 7, 697–709.
Patel, S., Roelke, C.T., Rademacher, D.J., Cullinan, W.E., Hillard, C.J., 2004. Endocannabinoid signaling negatively modulates stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Endocrinology 145, 5431–5438.
Piomelli, D., 2003. The molecular logic of endocannabinoid signalling. Nat. Rev. Neurosci. 4, 873–884.
Robinson, S.A., Loiacono, R.E., Christopoulos, A., Sexton, P.M., Malone, D.T., 2010. The effect of social isolation on rat brain expression of genes associated with endocannabinoid signaling. Brain Res. 1343, 153–167.
Rodriguez, J.J., Mackie, K., Pickel, V.M., 2001. Ultrastructural localization of the CB1 cannabinoid receptor in mu-opioid receptor patches of the rat Caudate putamen nucleus. J. Neurosci. 21, 823–833.
Rubino, T., Patrini, G., Massi, P., Fuzio, D., Vigano, D., Giagnoni, G., Parolaro, D., 1998. Cannabinoid-precipitated withdrawal: a time-course study of the behavioral aspect and its correlation with cannabinoid receptors and G protein expression. J. Pharmacol. Exp. Ther. 285, 813–819.
Rubino, T., Vigano, D., Costa, B., Colleoni, M., Parolaro, D., 2000a. Loss of cannabinoid-stimulated guanosine 5'-O-(3-[(35)S]Thiotriphosphate) binding without receptor

down-regulation in brain regions of anandamide-tolerant rats. J. Neurochem. 75, 2478–2484.
Rubino, T., Vigano, D., Massi, P., Parolaro, D., 2000b. Changes in the cannabinoid receptor binding, G protein coupling, and cyclic AMP cascade in the CNS of rats tolerant to and dependent on the synthetic cannabinoid compound CP55,940. J. Neurochem. 75, 2080–2086.
Rubino, T., Vigano, D., Massi, P., Parolaro, D., 2003. Cellular mechanisms of Delta 9-tetrahydrocannabinol behavioural sensitization. Eur. J. Neurosci. 17, 325–330.
Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., Weisstaub, N., Lee, J., Duman, R., Arancio, O., Belzung, C., Hen, R., 2003. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. Science 301, 805–809.
Sinha, R., 2001. How does stress increase risk of drug abuse and relapse? Psychopharmacol. (Berl) 158, 343–359.
Solinas, M., Justinova, Z., Goldberg, S.R., Tanda, G., 2006. Anandamide administration alone and after inhibition of fatty acid amide hydrolase (FAAH) increases dopamine levels in the nucleus accumbens shell in rats. J. Neurochem. 98, 408–419.
Solinas, M., Yasar, S., Goldberg, S.R., 2007. Endocannabinoid system involvement in brain reward processes related to drug abuse. Pharmacol. Res. 56, 393–405.
Solinas, M., Goldberg, S.R., Piomelli, D., 2008. The endocannabinoid system in brain reward processes. Br. J. Pharmacol. 154, 369–383.
Solinas, M., Thiriet, N., El Rawas, R., Lardeux, V., Jaber, M., 2009. Environmental enrichment during early stages of life reduces the behavioral, neurochemical, and molecular effects of cocaine. Neuropsychopharmacology 34, 1102–1111.
Solinas, M., Thiriet, N., Chauvet, C., Jaber, M., 2010. Prevention and treatment of drug addiction by environmental enrichment. Prog. Neurobiol.
Stairs, D.J., Bardo, M.T., 2009. Neurobehavioral effects of environmental enrichment and drug abuse vulnerability. Pharmacol. Biochem. Behav. 92, 377–382.
Steiner, M.A., Wotjak, C.T., 2008. Role of the endocannabinoid system in regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. Prog. Brain Res. 170, 397–432.
Stella, N., Schweitzer, P., Piomelli, D., 1997. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. Nature 388, 773–778.
Sugiura, T., Kondo, S., Sukagawa, A., Nakane, S., Shinoda, A., Itoh, K., Yamashita, A., Waku, K., 1995. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. Biochem. Biophys. Res. Commun. 215, 89–97.
Surget, A., Saxe, M., Leman, S., Ibarguen-Vargas, Y., Chalon, S., Griebel, G., Hen, R., Belzung, C., 2008. Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal. Biol. Psychiatry 64, 293–301.
Tanda, G., Goldberg, S.R., 2003. Cannabinoids: reward, dependence, and underlying neurochemical mechanisms—a review of recent preclinical data. Psychopharmacol. (Berl) 169, 115–134.
Tasker, J.G., 2006. Rapid glucocorticoid actions in the hypothalamus as a mechanism of homeostatic integration. Obes. (Silver Spring) 14 (Suppl 5), 259S–265S.
Thiriet, N., Aunis, D., Zwiller, J., 2000. C-fos and egr-1 immediate-early gene induction by cocaine and cocaethylene in rat brain: a comparative study. Ann. NY Acad. Sci. 914, 46–57.
Thiriet, N., Jouvert, P., Gobaille, S., Solov'eva, O., Gough, B., Aunis, D., Ali, S., Zwiller, J., 2001. C-type natriuretic peptide (CNP) regulates cocaine-induced dopamine increase and immediate early gene expression in rat brain. Eur. J. Neurosci. 14, 1702–1708.
Thiriet, N., Amar, L., Toussay, X., Lardeux, V., Ladenheim, B., Becker, K.G., Cadet, J.L., Solinas, M., Jaber, M., 2008. Environmental enrichment during adolescence regulates gene expression in the striatum of mice. Brain Res. 1222, 31–41.
Thiriet, N., Gennequin, B., Lardeux, V., Chauvet, C., Decressac, M., Janet, T., Jaber, M., Solinas, M., 2010. Environmental enrichment does not reduce the rewarding and neurotoxic effects of methamphetamine. Neurotox. Res.
Thomas, E.A., Cravatt, B.F., Danielson, P.E., Gilula, N.B., Sutcliffe, J.G., 1997. Fatty acid amide hydrolase, the degradative enzyme for anandamide and oleamide, has selective distribution in neurons within the rat central nervous system. J. Neurosci. Res. 50, 1047–1052.
Tsou, K., Brown, S., Sanudo-Pena, M.C., Mackie, K., Walker, J.M., 1998a. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. Neuroscience 83, 393–411.
Tsou, K., Nogueron, M.I., Muthian, S., Sanudo-Pena, M.C., Hillard, C.J., Deutsch, D.G., Walker, J.M., 1998b. Fatty acid amide hydrolase is located preferentially in large neurons in the rat central nervous system as revealed by immunohistochemistry. Neurosci. Lett. 254, 137–140.
Ueda, N., Puffenbarger, R.A., Yamamoto, S., Deutsch, D.G., 2000. The fatty acid amide hydrolase (FAAH). Chem. Phys. Lipids 108, 107–121.
Valenti, M., Vigano, D., Casico, M.G., Rubino, T., Steardo, L., Parolaro, D., Di Marzo, V., 2004. Differential diurnal variations of anandamide and 2-arachidonoyl-glycerol levels in rat brain. Cell. Mol. Life Sci. 61, 945–950.
van Praag, H., Kempermann, G., Gage, F.H., 2000. Neural consequences of environmental enrichment. Nat. Rev. Neurosci. 1, 191–198.
Vigano, D., Valenti, M., Cascio, M.G., Di Marzo, V., Parolaro, D., Rubino, T., 2004. Changes in endocannabinoid levels in a rat model of behavioural sensitization to morphine. Eur. J. Neurosci. 20, 1849–1857.
Viveros, M.P., Marco, E.M., Llorente, R., Lopez-Gallardo, M., 2007. Endocannabinoid system and synaptic plasticity: implications for emotional responses. Neural Plast. 2007, 52908.
Xu, Z., Hou, B., Gao, Y., He, F., Zhang, C., 2007. Effects of enriched environment on morphine-induced reward in mice. Exp. Neurol. 204, 714–719.
Zangen, A., Solinas, M., Ikemoto, S., Goldberg, S.R., Wise, R.A., 2006. Two brain sites for cannabinoid reward. J. Neurosci. 26, 4901–4907.

Article 2: Loss of Environmental Enrichment Increases Vulnerability to Cocaine Addiction

Nader J.*, Chauvet C.*, El Rawas R.*, Favot L., Jaber M., Thiriet N., Solinas M.

Neuropsychopharmacology (2012), 37(7):1579-87

** Auteurs ayant contribué de façon équivalente*

Il est de plus en plus établi que l'exposition à un EE possède des effets préventifs et curatifs dans le cadre de l'addiction aux drogues d'abus (pour revue (Solinas et al, 2010)) *(cf. chapitre 2 de cette thèse)*. Par exemple, notre équipe a récemment démontré que, des souris élevées en EE, depuis le sevrage et jusqu'à l'âge adulte, présentent une diminution de la préférence de place conditionnée associée à la cocaïne (Solinas et al, 2009), à l'héroïne (El Rawas et al, 2009), et à la morphine (Xu et al, 2007), mais pas à la METH (Thiriet et al, 2011). Dans ces études, les animaux ont été exposés à l'EE de façon continue. Cependant, aucune étude n'a permis de déterminer si l'effet protecteur induit par l'EE contre l'addiction aux drogues est maintenu en cas d'arrêt de l'enrichissement environnemental.

Dans cette étude, nos souris ont été élevées en SE ou en EE pendant une durée de 2 mois (du sevrage jusqu'à l'âge adulte). Elles ont ensuite subi un «switch» environnemental de 7, 30 ou 90 jours. Nous avons ainsi obtenu : (1) le groupe SE>SE, dans lequel les souris ont été élevées en SE de façon continue; (2) le groupe SE>EE, dans lequel les souris ont été élevées en SE jusqu'à l'âge adulte puis en EE pendant 7, 30 ou 90 jours; (3) le groupe EE>EE, dans lequel les souris ont été élevées en EE de façon continue; et (4) le groupe EE>SE, dans lequel les souris ont été élevées en EE jusqu'à l'âge adulte puis en SE pendant 7, 30 ou 90 jours. Nous avons constaté que la perte des conditions enrichies résulte en une augmentation de la vulnérabilité des animaux aux effets récompensants de la cocaïne, mesurée par une augmentation de la préférence de place pour le compartiment associé à la cocaïne chez les souris EE>SE. Ce phénomène a été observé 7 et 30 jours suivant la perte des conditions enrichies.

Cette vulnérabilité accrue chez le groupe EE>SE a été associée à un état émotionnel négatif, mesuré 7 jours après le « switch » environnemental, par : une diminution du temps d'exploration du centre de l'arène dans l'Open Field, une augmentation de l'immobilité dans le test de la nage forcée et, une diminution du temps de toilettage dans le Splash test.

La sensibilité, induite par le « switch » environnemental, aux effets récompensants de la cocaïne a aussi été associée à une augmentation des taux d'ARNm du neuropeptide CRF dans le BNST, ainsi qu'à une augmentation de la phosphorylation du facteur CREB dans le BNST, ainsi que dans le Shell du NAc. Afin de valider l'implication du système CRF dans les conséquences négatives induites par la perte de l'enrichissement, nous avons administré l'antalarmin, un antagoniste du récepteur CRF1, pendant les 7 jours de «switch» environnemental. Nous avons alors observé une diminution de la sensibilité induite par la perte des conditions enrichies chez le groupe EE>SE traité avec l'antalarmin.

Ainsi donc, nos résultats indiquent que la perte des conditions de vie perçues comme positives induit la mise en place d'un état émotionnel négatif, favorisant ainsi le développement de l'addiction.

Neuropsychopharmacology (2012), 1–9
© 2012 American College of Neuropsychopharmacology. All rights reserved 0893-133X/12
www.neuropsychopharmacology.org

Loss of Environmental Enrichment Increases Vulnerability to Cocaine Addiction

Joëlle Nader[1,2,3,5], Chauvet Claudia[2,3,5], Rana El Rawas[2,3,5], Laure Favot[3,4], Mohamed Jaber[1,2,3], Nathalie Thiriet*[,1,2,3,6] and Marcello Solinas[1,2,3,6]

[1]INSERM U-1084, Experimental and Clinical Neurosciences Laboratory, Neurobiology and Neuropharmacology Addiction Group, Poitiers, France; [2]Institut de Biologie et Physiologie Cellulaires, CNRS, Poitiers, France; [3]University of Poitiers, 1 Rue Georges Bonnet, Poitiers, France; [4]Laboratoire Inflammation, Tissus Epithéliaux et Cytokines, Poitiers, France

Life experiences, especially during critical periods of maturation, such as adolescence, can dramatically affect vulnerability to diseases at adulthood. Early exposure to positive environmental conditions such as environmental enrichment (EE) has been shown to reduce the occurrence and the intensity of neurological and psychiatric disorders including drug addiction. However, whether or not exposure to EE during early stages of life would protect from addiction when, at adulthood, individuals may find themselves in non-enriched conditions has not been investigated. Here we show that switching mice from EE to non-enriched standard environments not only results in the loss of the preventive effects of EE but also increases the rewarding effects of cocaine. This enhanced vulnerability is associated with emotional distress and with increased levels in the mRNA levels of corticotropin releasing factor (CRF) in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST), as well as with increases in CREB phosphorylation in the BNST and in the shell of the nucleus accumbens. The increased sensitivity to the rewarding effects of cocaine is completely blocked by the CRF antagonist antalarmin, confirming a major role of the CRF system in the negative consequences of this environmental switch. These results indicate that positive life conditions during early stages of life, if they are not maintained at adulthood, may have negative emotional consequences and increase the risks to develop drug addiction.

Neuropsychopharmacology advance online publication, 15 February 2012; doi:10.1038/npp.2012.2

Keywords: addiction; emotion; adolescence; vulnerability factors; life experience

INTRODUCTION

Compelling evidence demonstrates that life experiences and environments, especially during early stages of life, highly influence the effects of drugs of abuse and have a major role in the development of drug addiction (Enoch, 2011; Swadi, 1999). In animal models of addiction, the importance of environmental conditions on subsequent effects of drugs of abuse has been clearly established. In particular, chronic exposure to stress induces neuronal adaptations that result in increased rewarding effects of drugs and higher vulnerability to addiction (Goeders, 2002; Koob, 2008; Kreek *et al*, 2005; Marinelli and Piazza, 2002; Sinha, 2001). The corticotropin releasing factor (CRF) system (Arborelius *et al*, 1999) and transcription factors, such as CREB (Carlezon *et al*, 2005), appear to have a major role in stress-induced alterations of drugs' effects (Carlezon *et al*, 2005; Koob, 2008). For example, it has been recently shown that chronic stress increases the rewarding effects of cocaine by increasing CRF signaling and consequently pCREB levels in several brain regions involved in stress reactions and reward processes (Kreibich *et al*, 2009), and CRF can increase phosphorylation of CREB in striatal neurons (Stern *et al*, 2011).

In parallel with these findings, accumulating evidence indicates that exposure to environmental enrichment (EE) during early stages of life reduces the effects of drugs of abuse and decreases the vulnerability to develop addiction (Carroll *et al*, 2009; Laviola *et al*, 2008; Solinas *et al*, 2010; Stairs and Bardo, 2009). For example, mice reared in EE from weaning to adulthood show reduced conditioned place preference (CPP) to cocaine and heroin (El Rawas *et al*, 2009; Solinas *et al*, 2009) but not to methamphetamine (Thiriet *et al*, 2011). In addition, rats reared in EE show reduced self-administration of amphetamine and cocaine (Bardo *et al*, 2001; Green *et al*, 2009; Green *et al*, 2002; Stairs *et al*, 2006). Although in most experiments investigating the effects of EE on drug addiction, animals were constantly exposed to EE, an important question that needs to be addressed is whether exposure to EE during early stages of

*Correspondence: Dr N Thiriet, INSERM U-1084, Experimental and Clinical Neurosciences Laboratory, Neurobiology and Neuropharmacology Addiction Group, Université de Poitiers, 1 Rue George Bonnet, 86022, Poitiers, France, Tel: 33 5 49 36 62 09, Fax: 33 5 49 45 40 14, E-mail: nathalie.thiriet@univ-poitiers.fr
[5]These authors contributed equally to the work.
[6]These authors contributed equally to the work.
Received 7 August 2011; revised 11 December 2011; accepted 29 December 2011

life would protect from addiction even if enrichment were discontinued.

In this study, we reared mice from weaning to adulthood in either a standard environment (SE) or EE, we then switched them to EE or SE and after 7, 30, or 90 days, we investigated the ability of cocaine (10 mg/kg) to induce CPP. Surprisingly, we found that, when an environmental switch occurred, exposure to EE during early stages of life not only did not protect from cocaine but also made mice more vulnerable to its reinforcing effects. This effect was age-dependent because mice that experienced EE and switch from EE to SE at adulthood, developed CPP similarly to control groups. The switch from EE to SE in young mice was associated with a negative emotional state and with increases in CRF levels in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) and increased phospo-CREB levels in the BNST and the nucleus accumbens (NAc) shell. Finally, we demonstrated that chronic blockade of CRF_1 receptors (CRF_1Rs) during the 7 days, intervening between the environmental switch and CPP conditioning, completely prevented switch-induced enhancement of the rewarding effects of cocaine.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

Male C57Bl/6J mice (Janvier, Le Genest Saint Isle, France) were housed in a temperature-controlled environment on a 12-h light/dark cycle with the lights on from 0700–1900 hours and had ad libitum access to food and water. All experimentation was conducted during the light period. Experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) for the care of laboratory animals.

Housing Environmental Conditions

After weaning (3 weeks of age), mice were randomly divided in two different housing environmental conditions, SE or EE, and kept in these housing conditions for 2 months. In rodents, this period encompasses adolescence and young adulthood. SE consisted of common cage housing ($25 \times 20 \times 15\,cm^3$). The EE consisted of larger ($60 \times 38 \times 20\,cm^3$) cages containing constantly a small house and a running wheel for voluntary exercise, and four to five toys that were changed once a week with new toys of different shape and color. All mice were housed in groups of 4.

A separate group of animals was housed in SE until adulthood (approximately 11 weeks of age). Subsequently, mice were randomly divided in two different housing environmental conditions, SE or EE, and kept in these housing conditions for 2 months and environmental switch was performed only thereafter (adult control group).

General Experimental Design

At adulthood (11 weeks of age), half of the mice in one environmental condition were switched to the other condition and kept in the animal facility until testing or killing (Figure 1). CPP experiments were conducted 7, 30, or 90 days after the switch. This allowed selecting a 7-day time point for all other procedures. Control groups of animals were kept in their original environment for equivalent periods of time. We compared four experimental groups: (1) SE–SE mice that were housed in SE throughout the experiment; (2) SE–EE mice that were housed in SE until adulthood and then switched to EE; (3) EE–EE mice that were housed in EE throughout the experiment and (4) EE–SE mice that were housed in EE until adulthood and then switched to SE. For adult control experiments, we obtained the same four experimental groups, and tests for CPP were performed 7 days after the switch.

For antalarmin experiments, a different 2×2 design was used with two environmental conditions (EE–SE and SE–SE) and two treatments (antalarmin or vehicle) (Figure 5a). Starting immediately after the switch, mice were injected twice per day (1800–0800 hours) with the CRF_1R antagonist antalarmin (Sigma-Aldrich; www.sigmaaldrich.com) at a dose of 10 mg/kg. A total of 13 injections were administered with the last administration being 15–18 hours before the preconditioning session of CPP in order to avoid any interference of antalarmin treatment and CPP procedures.

Rewarding Effects of Cocaine

CPP experiments with cocaine (10 mg/kg i.p.) were performed as previously described (Solinas *et al*, 2009). CPP procedure consisted of three phases: preconditioning (one 30-min session), conditioning (two 30-min sessions per day for 3 days), and test (one 30-min session). Preference scores, which served as a measure of rewarding effects of

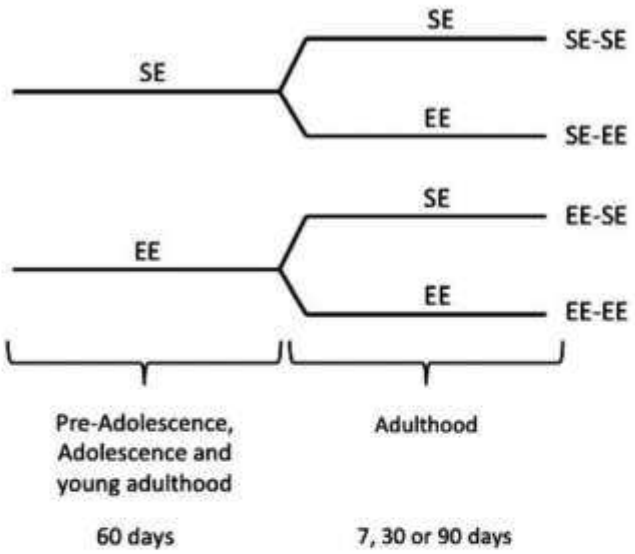


Figure 1 Schematic representation of the experimental design. Mice were initially housed either in SEs or EEs from weaning to adulthood. At adulthood (approximately post-natal day, PND 77), mice were either switched to the other environmental condition or they were kept in the same environmental condition as controls. CPP experiments were conducted 7, 30, or 90 days after the switch. Note that different groups of mice were used for each time point. Note also that for the adult group, a similar protocol was used, but exposure to EE started at adulthood (approximately PND 77) and environmental switch occurred after 8 weeks (approximately PND 135).

cocaine, were calculated by subtracting the time in seconds spent during the pretest from the time spent during the test day in the compartment paired to cocaine injections.

Emotional Distress

In separate groups of mice, open field (OF), forced swim test (FST), and splash test were performed to measure emotional distress. For the OF test, animals were put in the middle of a white arena ($50 \times 50 \times 50\,cm^3$) and left free to explore it for 10 min. The behavior of mice was recorded using a video camera and analyzed by Viewpoint software (Viewpoint Life Sciences, Lyon, France; www.vplsi.com/news.php). A circle of 40 cm diameter was virtually drawn in the center of the arena and the percentage of time spent in this area over the total time was used as a primary measure of anxiety-like behavior. For FST experiments, mice were placed in a beaker ($21.4 \times 17.2\,cm^2$) of water (23–25 °C) and their behavior was recorded using a video camera for 6 min and scored by an observer blind to the environmental manipulation. Immobility time, defined as the absence of all movements except those required to keep the head of the mouse above the water, was measured. The splash test was used to measure emotional distress (Santarelli *et al*, 2003; Surget *et al*, 2008). In brief, the dorsal coat of the mouse was sprinkled with a 10% sucrose solution with a manual sprayer (two pulverizations delivering approximately 1 ml). Because of its viscosity, the sucrose solution triggers a licking and grooming behavior. The first grooming latency and the time spent grooming were recorded for a period of 5 min.

Quantitative Real Time Reverse Transcription-PCR (RT-PCR)

Seven days after the environmental switch, mice were decapitated and brains were removed, immediately frozen on dry ice, and stored at −80 °C until use. Sections (200 μm) were cut using a cryostat and BNST or amygdala were punched out using a 1-mm microdissecting needle. RNAs for RT-PCR quantification were obtained as previously described (Thiriet *et al*, 2008). The sequences of primers used were designed using Primer-BLAST software (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome). The sequence for CRF_1R was the same used by Sztainberg *et al* (2010). Samples were normalized to control housekeeping genes (GAPDH) and reported according to the delta CT method as $2^{-\Delta CT} = 2^{-(CT\ gene\ of\ interest - CT\ GAPDH)}$, where CT corresponds to the cycle threshold when fluorescence is first detected. The changes in $2^{-\Delta CT}$ were normalized over SE–SE values and used for analysis.

Phospho-CREB Immunohistochemistry

Seven days after the environmental switch, mice were anesthetized, transcardially perfused, and brain processed as previously described (Solinas *et al*, 2008). Antibodies directed at the phosphorylated form of CREB (Ser 133) (Cell signaling; www.cellsignal.com) were used. Pictures of sections (three per mouse) were taken using computerized image analysis software (MorphoStrider, ExploraNova, La Rochelle, France) and were quantified bilaterally using cell count analysis software (Mercator, ExploraNova, La Rochelle, France) by an experimenter blind to group assignments.

Drugs

Cocaine HCl was obtained from the Research Triangle Institute and dissolved in sterile saline solutions (0.9%). Antalarmin (Sigma-Aldrich) was dissolved in 10% DMSO in saline solutions. All drugs were administered i.p. in a volume of 1 ml/100 g.

Statistical Analysis

All results are presented as group means (±SEM). Differences between groups were assessed by one-way with environmental history as factor or two-way ANOVA with environmental history and time as factors. Results showing significant overall changes were subjected to Student–Newman–Keuls *post-hoc* test. Differences were considered significant when $P<0.05$.

RESULTS

Switch from EE to SE Increases the Rewarding Effects of Cocaine

Consistent with our previous findings (Solinas *et al*, 2009), cocaine induced significant preference in mice that were housed continuously in SE (SE–SE) but not in mice that were housed continuously in EE (EE–EE) (Figures 2a–c). In mice that were housed in SE from weaning to adulthood and were switched to EE before the beginning of CPP conditioning (SE–EE), cocaine still induced significant preference 7 days after the switch (Figure 2a). However, 30 and 90 days after the switch, SE–EE mice appear little or not at all sensitive to the rewarding effects of cocaine (Figures 2b and c), indicating that extensive exposure to EE can have protective effects against addiction even when provided at adulthood. Surprisingly, and opposite to our predictions, in mice that were housed in EE from weaning to adulthood and were switched to SE (EE–SE), cocaine induced a very strong preference (500 s, ie, 200% more than SE–SE controls) when CPP conditioning was performed 7 and 30 days after the environmental switch (Figures 2a and b). Only after 90 days in SE, EE–SE mice returned to preference scores comparable to controls (SE–SE) (Figure 2c). The effects of environmental switch as a function of time for each group are shown in Supplementary Figure 1. Statistical analysis revealed a significant effect of environmental history ($F_{3,\ 119} = 8.00$, $P<0.0001$), time ($F_{2,\ 119} = 6.80$, $P<0.01$), and a significant environmental history × time interaction effect ($F_{6,\ 119} = 3.36$, $P<0.01$).

Subsequently, we investigated whether the effects of environmental switch depended on the age at which animals were exposed to EE before being switched or not to SE. When mice were housed in EE at adulthood, exposure to EE for 2 months (EE–EE), but not for 1 week (SE–EE), was able to block the development of cocaine CPP (Figure 2d). On the other hand, mice housed in EE at adulthood and then switched to SE for 1 week (EE–SE) showed a CPP that was similar to that of control SE–SE mice (Figure 2d). These results show that although the protective effects of EE are

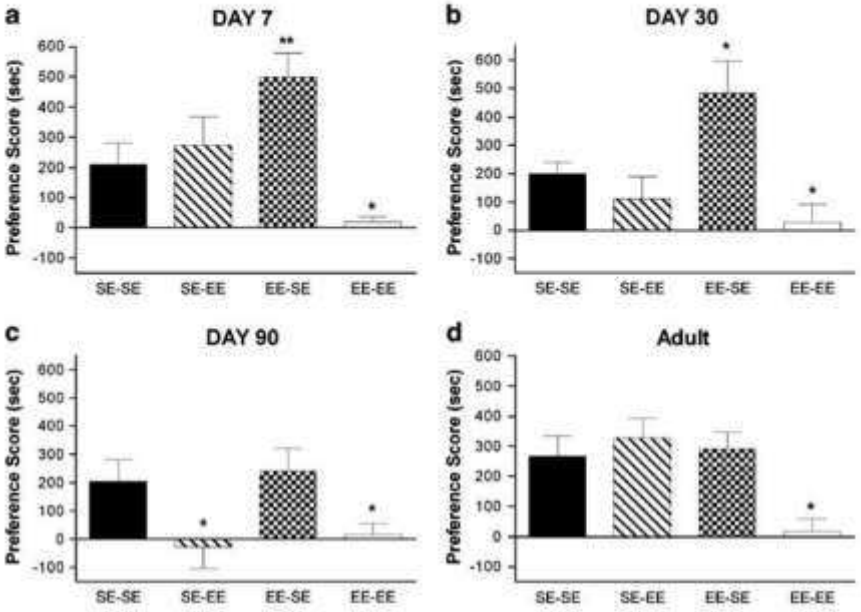


Figure 2 Effects of environmental switch on the rewarding effects of cocaine. In mice housed in EE or SE from weaning to adulthood, cocaine-induced CPP was investigated (a) 7, (b) 30, or (c) 90 days after the environmental shift in mice switched from SE to EE (SE–EE) or EE to SE (EE–SE) and their non-switched controls (SE–SE and EE–EE). In mice housed in EE or SE for 2 months starting at adulthood (d), cocaine-induced CPP was investigated 7 days after the environmental shift. Preference score is the difference in the time (±SEM) spent in the cocaine-paired compartment before and after conditioning ($n = 10$–11 per group). Post Student-Newman-Keuls $^{*}P<0.05$ and $^{**}P<0.01$ different from SE–SE controls.

rapidly lost after return to SE, this switch at adulthood does not cause an increase in the rewarding effects of cocaine. Statistical analysis showed a significant effect of environmental history with EE differing from all other groups (one-way ANOVA, $F_{3,\ 36} = 6.44$, $P<0.01$).

Switch from EE to SE Produces a Negative Emotional State

We then investigated whether the enhanced sensitivity to the rewarding effects of cocaine was associated with a negative emotional state. Seven days after the switch, in an OF test, mice switched from EE to SE showed low levels of exploration of the center of the arena, a behavior that is consistent with high levels of anxiety. These levels were comparable to those of SE–SE but significantly lower than those of both SE–EE and EE–EE mice (one-way ANOVA, environmental history, $F_{3,\ 31} = 4.94$, $P<0.01$). On the other hand, in a FST procedure, we found that over a 6-min test EE–EE mice showed less immobility than other groups (Figure 3a) (one-way ANOVA, $F_{3,\ 33} = 3.35$, $P<0.05$), confirming an antidepressant-like effect of enrichment (Laviola *et al*, 2008; Nithianantharajah and Hannan, 2009; Solinas *et al*, 2010). EE–SE mice did not differ from SE–SE or SE–EE mice in the total time of immobility during the 6-min test (Figure 3b). However, a closer look at time courses revealed that EE–SE showed low immobility levels similar to EE–EE in the first 2-min bin of the test, but in the second and third 2-min bins, they showed immobility levels similar to those of SE–SE and SE–EE mice (Figure 3c). Indeed, when expressed as % of initial immobility levels, EE–SE showed increases in immobility that were significantly higher than all other groups (Figure 3d) (one-way ANOVA, environmental history, $F_{3,\ 33} = 3.10$, $P<0.05$). We interpreted low levels of immobility during the initial phase of the test as a consequence of motor fitness of EE–SE mice, due to months of physical activity in EE (Madronal *et al*, 2010; Munn *et al*, 2011; Pietropaolo *et al*, 2006). On the other hand, we interpreted the rapid increase in immobility found over the course of the FST session in EE–SE as a manifestation of enhanced behavioral despair and of an underlying negative emotional state. To confirm this hypothesis, we used the splash test, a procedure sensitive to chronic stress (Santarelli *et al*, 2003; Surget *et al*, 2008) that is independent from motor performance. We found that mice switched from EE to SE show significantly longer latency to start grooming behavior and spend less time grooming than all other groups of mice (Figure 3e) (one-way ANOVA, latency: $F_{3,\ 40} = 3.37$, $P<0.05$; grooming time: $F_{3,\ 40} = 5.12$, $P<0.01$) confirming a low emotional state in these mice.

Switch from EE to SE is Associated with Increases in mRNA Levels of CRF

CRF is one of the major neurotransmitters involved in stress responses and emotions (Arborelius *et al*, 1999), and it has been recently demonstrated that the anxiolytic effects of EE depend on the CRF system in amygdaloid regions (Sztainberg *et al*, 2010). Therefore, we hypothesized that the emotional distress induced by the switch from EE to SE could be mediated by alteration in the expression of members of the CRF system in amygdaloid nuclei. Using quantitative RT-PCR, we found that switch from EE to SE is associated with a selective increase in CRF mRNA in the BNST (Figure 4a) (one-way ANOVA, $F_{3,\ 34} = 3.10$, $P<0.05$) but not in the amydgala (Figure 4b). No significant changes in CRF_1R or CRF_2R mRNA were found in either the BNST or the amydgala (Figures 4a and b).

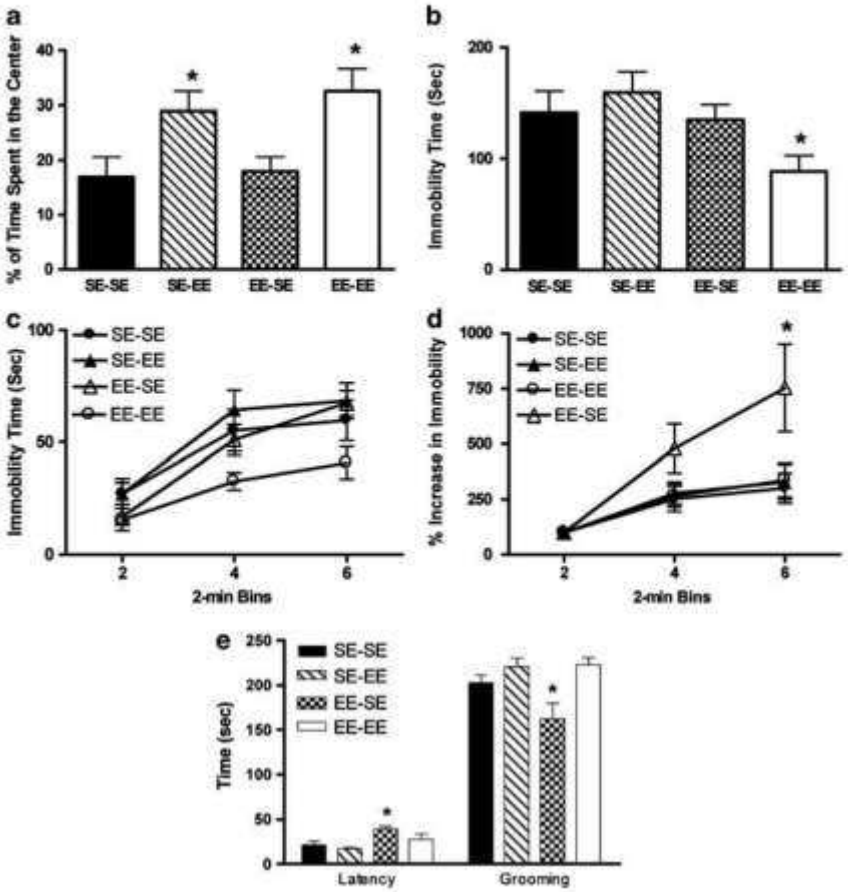


Figure 3 Effects of environmental switch on emotional responses. Stress responses measured in the OF, FST and splash test in mice switched from SE to EE (SE–EE) or EE to SE (EE–SE) and their non-switched controls (SE–SE and EE–EE) 7 days after the environmental switch. Panel (a) shows percentage of time spent in the center of the OF arena. Panel (b) shows total immobility and panel (c) shows time course for immobility during a 6-min FST. Panel (d) shows the percentage increase in immobility in the second and third 2-min FST compared with the initial 2-min bin. Panel (e) shows latency to grooming and time spent grooming in the splash test. Data are expressed as mean (± SEM) of group values ($n = 10$–11 per group). Post Student-Newman-Keuls $^*P < 0.05$ different from SE–SE controls.

Blockade of CRF_1R Eliminates the Enhanced Sensitivity to Cocaine Induced by Environmental Switch

We then investigated whether the increased CRF tone associated with switch from EE to SE was responsible for the enhanced sensitivity to the rewarding effects of cocaine. For this, we switched animals and treated them with the CRF_1R antagonist antalarmin (10 mg/kg twice per day) or vehicle during the 7 days, occurring between the environmental switch and the beginning of cocaine CPP conditioning (Figure 5a). In order to verify that chronic treatment with antalarmin itself did not disrupt subsequent CPP, control mice were housed in SE and received antalarmin or vehicle according to the same protocol. We found that antalarmin completely abolished the increase in cocaine rewarding effects induced by switch from EE to SE (Figure 5b) (one-way ANOVA, $F_{3,\ 39} = 3.32$, $P < 0.05$).

Switch from EE to SE is Associated with Increases in pCREB Immunoreactivity Levels in the BNST and in the NAc Shell

It has been shown that repeated stress increases reactivity to cocaine through an increase in CREB phosphorylation in limbic areas and that these effects of stress are lost in mice lacking CREB (Kreibich *et al*, 2009). We therefore investigated whether environmental switch could lead to increases in levels of pCREB in several brain areas such as the NAc shell and core, the lateral septum (LS), the BNST, the basolateral amygdala (BLA), basomedial amygdala, and central amygdala (CeA) (Supplementary Figure 2). We found that switch from EE to SE increased pCREB immunoreactivity levels selectively in the BNST and NAc shell (Figure 6) (one-way ANOVA, NAc: $F_{3,\ 26} = 3.42$, $P < 0.05$; BNST: $F_{3,\ 26} = 5.13$, $P < 0.01$) but not in the other regions.

DISCUSSION

Exposure to EE has been shown to have beneficial effects on neurodegenerative disorders, such as Parkinson Disease, Alzheimer Disease, and Huntington Disease, and psychiatric disorders such as anxiety, depression and schizophrenia (Baroncelli *et al*, 2010; Cirulli *et al*, 2010; Laviola *et al*, 2008; Nithianantharajah and Hannan, 2009; Rosenzweig and Bennett, 1996). In addition, EE has been shown to have both preventive and restorative effects on drug addiction (Carroll *et al*, 2009; Laviola *et al*, 2008; Solinas *et al*, 2010; Stairs and Bardo, 2009). For example, it has been recently reported that mice housed in EE from weaning to adulthood

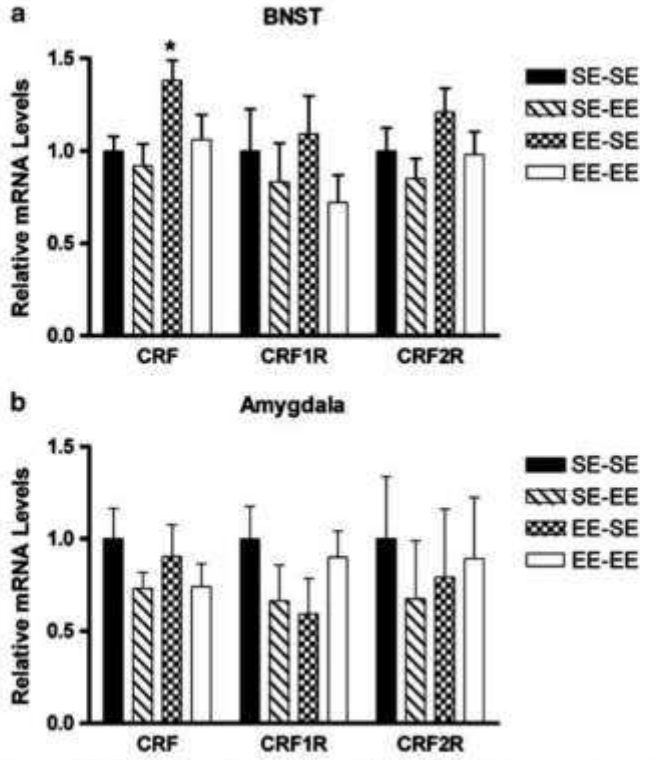


Figure 4 Effects of environmental switch on the mRNA expression of CRF, CRF_1R and CRF_2R in amygdaloid nuclei. mRNA levels of CRF, CRF_1R and CRF_2R in the (a) BNST and (b) amygdala in mice switched from SE to EE (SE–EE) or EE to SE (EE–SE) and their non-switched controls (SE–SE and EE–EE) 7 days after the environmental switch. A significant increase in the levels of CRF mRNA was found in the BNST only in EE–SE mice. Data are expressed as mean (±SEM) of group values ($n=9$–10 per group). Post Student-Newman-Keuls *$P<0.05$ different from SE–SE controls.

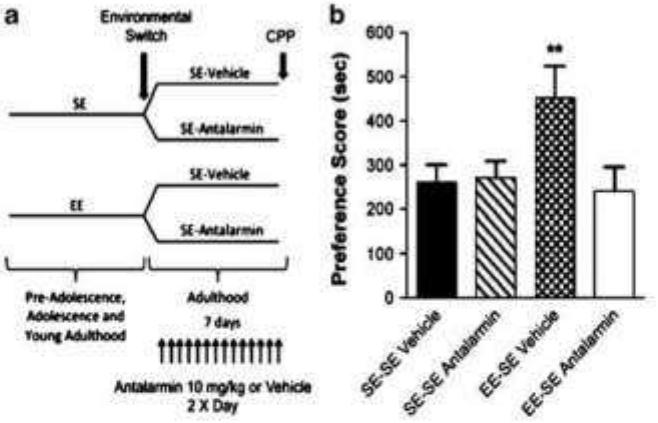


Figure 5 Effects of CRF_1R blockade following environmental switch on cocaine-induced CPP. (a) Schematic representation of the experimental design. Cocaine-induced CPP was investigated in mice switched from EE to SE (EE–SE) and treated with the CRF_1R antagonist antalarmin (10 mg/kg i.p. twice per day) or vehicle during the 7 days occurring between the switch and the beginning of the CPP conditioning sessions. Control mice were housed always in SE and were treated with antalarmin or vehicle. (b) Chronic treatment with antalarmin completely blocked the enhanced response to cocaine induced by the switch from EE to SE. Preference score is the difference in the time (±SEM) spent in the cocaine-paired compartment before and after conditioning ($n=10$–11 per group). Post Student-Newman-Keuls **$P<0.01$ different from SE–SE controls.

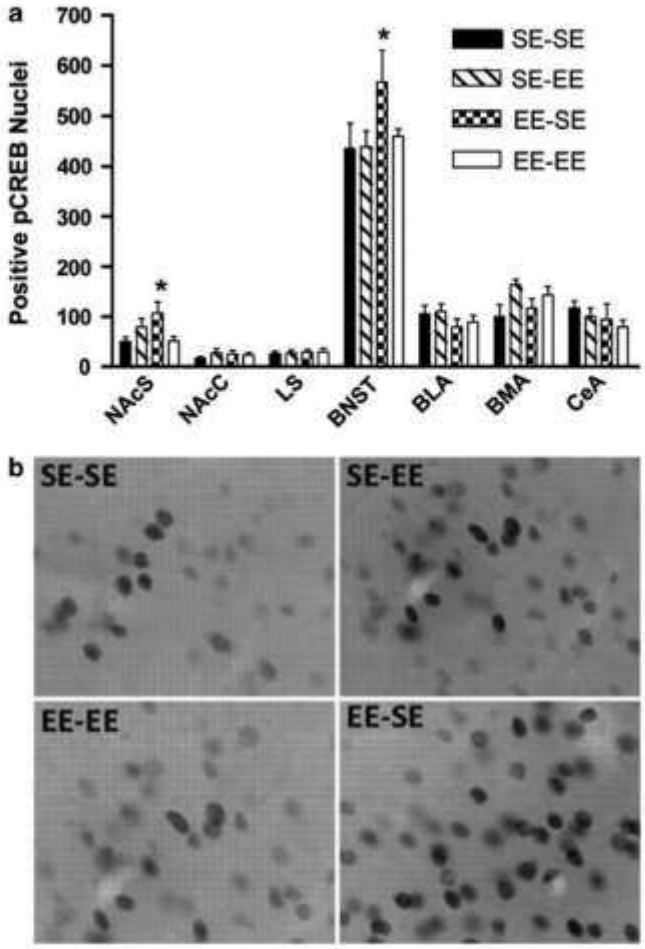


Figure 6 Effects of environmental switch on pCREB levels. (a) pCREB-positive nuclei were quantified in the NAc shell, NAc core, the lateral septum (LS), the BNST, the basolateral amygdala (BLA), the basomedial amygdala (BMA), and the central amygdala (CeA) of mice switched from SE to EE (SE–EE) or EE to SE (EE–SE) and their non-switched controls (SE–SE and EE–EE) 7 days after the environmental switch. EE–EE mice show a significant increase in pCREB expression only in the NAc shell and the BNST. Data are expressed as mean (±SEM) of group values ($n=7$–8 per group). Post Student-Newman-Keuls *$P<0.05$ different from SE–SE controls. (b) Representative photomicrograph illustrating quantitative data of pCREB-immunoreactive nuclei within the BNST for each group (scale bar, 10 μm).

show reduced rewarding effects to cocaine (Solinas *et al*, 2009), heroin, and morphine (El Rawas *et al*, 2009; Xu *et al*, 2007). Here we aimed at determining whether the positive effects of EE on cocaine vulnerability would persist after the discontinuation of EE. Surprisingly, the main finding of the present study is that discontinuation of EE leads to increases in the rewarding effects of cocaine in comparison with mice that have been exposed to neutral SE throughout the experiment. Thus, not only the positive effects of EE are not long lasting but also depriving mice from EE increases vulnerability to cocaine. Therefore, mice that have been exposed to a rich, stimulating environment could find a SE rather poor, and thus the switch from EE to SE would be perceived as stressful and aversive. Somewhat similarly, it has been shown that DBA mice that have been socially housed for 19 days and then switched to single housing self-administer more cocaine than mice that are always kept in single housing (van der Veen *et al*, 2007).

Given these somewhat unexpected results, we hypothesized that the switch-induced increase in cocaine rewarding effects was a consequence of a negative emotional stress. In fact, stress is known to increase the reinforcing effects of drugs (Goeders, 2002; Koob, 2008; Kreek *et al*, 2005; Marinelli and Piazza, 2002; Sinha, 2001), and accumulating evidence shows that exposure to stress increases the ability of cocaine to induce CPP (Kreibich *et al*, 2009; McLaughlin *et al*, 2006; McLaughlin *et al*, 2003). Consistent with this hypothesis, we found that emotional responses were altered in mice switched from EE to SE. In a FST, a measure of emotional behavior that is dependent on physical activity, we found that EE–SE mice initially show low levels of immobility probably because of motor fitness produced by months of physical activity in EE (Madronal *et al*, 2010; Munn *et al*, 2011; Pietropaolo *et al*, 2006). However, this apparent beneficial effect quickly disappeared and EE–SE mice showed increased immobility levels that were significantly higher than other groups, a behavior that we interpreted as a despair-like behavior. We confirmed low emotional responses in these mice, in the splash test, a measure of emotionality that is independent from physical performance (Santarelli *et al*, 2003; Surget *et al*, 2008). In fact, the switch from EE to SE was associated with a decrease in self-grooming, a behavior also found in chronically stressed mice (Santarelli *et al*, 2003; Surget *et al*, 2008). In the OF test, EE–SE mice explored the center of the arena less than EE–EE and SE–EE mice, suggesting that the effects of EE on this anxiety-related behavior are rapidly lost when EE is discontinued and, conversely, that they can appear rapidly when EE is implemented. However, the OF test was not able to discriminate between EE–SE and SE—SE mice as both these groups showed low levels of exploration. Therefore, the negative emotional consequences of environmental switch from EE to SE appear to be subtle and may be revealed by some but not all behavioral tests commonly used to study stress-related responses.

An important aspect of the negative effects of deprivation of EE is that they appear to be age-dependent. In fact, only when exposure to EE occurred at early stages of life, switch from EE to SE increased the rewarding effects of cocaine. In contrast, when exposure to EE occurred at adulthood, switch from EE to SE simply lead to the loss of the effects of EE but not to an increase in the rewarding effects of cocaine. Therefore, these results support the hypothesis that adolescence and young adulthood represent critical periods of development during which external factors and environmental conditions may have a great impact on the vulnerability to drugs (Ernst *et al*, 2009; Marco *et al*, 2011; Spear, 2000). On the other hand, during adulthood, individuals may be more able to cope and overcome environmental changes even when they may represent a deterioration compared with previous conditions.

The CRF system is known to have a major role in stress responses and emotions (Arborelius *et al*, 1999). In addition, this system has been recently shown to be responsible for the anxiolytic effects of EE (Sztainberg *et al*, 2010) and in the stress-induced increases in cocaine CPP (Kreibich *et al*, 2009), suggesting that it may also be involved in the behavioral consequences of environmental switch. In addition, CRF has been shown to have major roles in drug-taking and drug-seeking behavior (Corominas *et al*, 2010; Koob, 2008), and in models of relapse (Buffalari *et al*, 2011; Shalev *et al*, 2010). In agreement with this role, we found that switch from EE to SE produces significant increases in CRF mRNA levels in the BNST, a brain region critically involved in stress responses and emotions (Davis and Whalen, 2001). The causal role of the CRF system, especially CRF_1R, in the negative consequence of switching from EE to SE on the vulnerability to addiction was confirmed by the fact that chronic blockade of CRF_1R by antalarmin prevented the enhancement of the rewarding effects of cocaine. Similarly, in a previous study, it was found that injections of antalarmin prior to exposure to a forced swim stress prevented an enhancement in cocaine CPP (Kreibich *et al*, 2009). In the same study, it was found that forced swim stress produced an increase in CREB phosphorylation in the NAc shell, NAc core, LS, the BNST, the BLA, and CeA, and that CREB-deficient mice did not show any stress-induced enhancement of cocaine CPP (Kreibich *et al*, 2009). In the present study, the switch from EE to SE increased pCREB levels in the NAc shell and in the BNST but not in the other brain areas investigated, suggesting that different stressors can induce different patterns of CREB activation. Increases in pCREB in the BNST and NAc shell have been shown to be associated with depression-like behaviors, enhanced responses to stress, and anxiety (Carlezon *et al*, 2005; Curtis *et al*, 2002; Kreibich *et al*, 2009). Although the role of CREB in the NAc on cocaine reward has been clearly established (Carlezon *et al*, 2005; Kreibich *et al*, 2009), future studies will be necessary to better define the role of CREB in the BNST on these effects. Nevertheless, a recent study has shown that CREB phosphorylation in the BNST is necessary for stress-induced reinstatement of cocaine CPP (Briand *et al*, 2010).

An important implication of our findings is that although positive life conditions, if maintained, may provide protection from drug addiction (Carroll *et al*, 2009; Laviola *et al*, 2008; Stairs and Bardo, 2009), discontinuation of EE increases vulnerability to drug addiction. Although these results deserve confirmation with operant self-administration procedures, they may have implication for the understanding of the consequences of changes in environmental conditions that may occur in the passage from adolescence to adulthood. In fact, although it is generally agreed that addiction is associated with poor socioeconomic and poor family conditions (Swadi, 1999), many people belonging to families with conditions that appear rather positive also develop addiction to drugs and in particular to cocaine. Our results suggest that changes from living conditions perceived as positive to less favorable environmental conditions could lead to negative emotional states that can favor the development of psychiatric illness such as addiction.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Centre National pour la Recherche Scientifique, University of Poitiers, Mission Interministérielle de la Lutte contre les Drogues et la Toxicomanie (MILDT-INSERM-INCA 2007–2009) and the Contrat de Projet Etat Region (CPER) no. 5. JN and CC are recipients of PhD fellowship by the French Minister of

Research. RER was recipient of a CNRS BDI-PED fellowship. We thank Steve Goldberg and Jose Moron-Concepcion for comments on the manuscript.

DISCLOSURE

The authors declare that, except for income received from their primary employer, no financial support or compensation has been received from any individual or corporate entity over the past 3 years for research or professional service and there are no personal financial holdings that could be perceived as constituting a potential conflict of interest.

REFERENCES

Arborelius L, Owens MJ, Plotsky PM, Nemeroff CB (1999). The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. *J Endocrinol* **160**: 1–12.

Bardo MT, Klebaur JE, Valone JM, Deaton C (2001). Environmental enrichment decreases intravenous self-administration of amphetamine in female and male rats. *Psychopharmacology (Berl)* **155**: 278–284.

Baroncelli L, Braschi C, Spolidoro M, Begenisic T, Sale A, Maffei L (2010). Nurturing brain plasticity: impact of environmental enrichment. *Cell Death Differ* **17**: 1092–1103.

Briand LA, Vassoler FM, Pierce RC, Valentino RJ, Blendy JA (2010). Ventral tegmental afferents in stress-induced reinstatement: the role of cAMP response element-binding protein. *J Neurosci* **30**: 16149–16159.

Buffalari DM, Baldwin CK, Feltenstein MW, See RE (2011). Corticotrophin releasing factor (CRF) induced reinstatement of cocaine seeking in male and female rats. *Physiol Behav* **105**: 209–214.

Carlezon Jr WA, Duman RS, Nestler EJ (2005). The many faces of CREB. *Trends Neurosci* **28**: 436–445.

Carroll ME, Anker JJ, Perry JL (2009). Modeling risk factors for nicotine and other drug abuse in the preclinical laboratory. *Drug Alcohol Depend* **104**(Suppl 1): S70–S78.

Cirulli F, Berry A, Bonsignore LT, Capone F, D'ndrea I, Aloe L *et al* (2010). Early life influences on emotional reactivity: evidence that social enrichment has greater effects than handling on anxiety-like behaviors, neuroendocrine responses to stress and central BDNF levels. *Neurosci Biobehav Rev* **34**: 808–820.

Corominas M, Roncero C, Casas M (2010). Corticotropin releasing factor and neuroplasticity in cocaine addiction. *Life Sci* **86**: 1–9.

Curtis AL, Bello NT, Connolly KR, Valentino RJ (2002). Corticotropin-releasing factor neurones of the central nucleus of the amygdala mediate locus coeruleus activation by cardiovascular stress. *J Neuroendocrinol* **14**: 667–682.

Davis M, Whalen PJ (2001). The amygdala: vigilance and emotion. *Mol Psychiatry* **6**: 13–34.

El Rawas R, Thiriet N, Lardeux V, Jaber M, Solinas M (2009). Environmental enrichment decreases the rewarding but not the activating effects of heroin. *Psychopharmacology (Berl)* **203**: 561–570.

Enoch MA (2011). The role of early life stress as a predictor for alcohol and drug dependence. *Psychopharmacology* **214**: 17–31.

Ernst M, Romeo RD, Andersen SL (2009). Neurobiology of the development of motivated behaviors in adolescence: a window into a neural systems model. *Pharmacol Biochem Behav* **93**: 199–211.

Goeders NE (2002). Stress and cocaine addiction. *J Pharmacol Exp Ther* **301**: 785–789.

Green TA, Alibhai IN, Roybal CN, Winstanley CA, Theobald DE, Birnbaum SG *et al* (2009). Environmental Enrichment Produces a Behavioral Phenotype Mediated by Low Cyclic Adenosine Monophosphate Response Element Binding (CREB) Activity in the Nucleus Accumbens. *Biol Psychiatry* **67**: 28–35.

Green TA, Gehrke BJ, Bardo MT (2002). Environmental enrichment decreases intravenous amphetamine self-administration in rats: dose-response functions for fixed- and progressive-ratio schedules. *Psychopharmacology (Berl)* **162**: 373–378.

Koob GF (2008). A role for brain stress systems in addiction. *Neuron* **59**: 11–34.

Kreek MJ, Nielsen DA, Butelman ER, LaForge KS (2005). Genetic influences on impulsivity, risk taking, stress responsivity and vulnerability to drug abuse and addiction. *Nat Neurosci* **8**: 1450–1457.

Kreibich AS, Briand L, Cleck JN, Ecke L, Rice KC, Blendy JA (2009). Stress-induced potentiation of cocaine reward: a role for CRF R1 and CREB. *Neuropsychopharmacology* **34**: 2609–2617.

Laviola G, Hannan AJ, Macri S, Solinas M, Jaber M (2008). Effects of enriched environment on animal models of neurodegenerative diseases and psychiatric disorders. *Neurobiol Dis* **31**: 159–168.

Madronal N, Lopez-Aracil C, Rangel A, del Rio JA, Delgado-Garcia JM, Gruart A (2010). Effects of enriched physical and social environments on motor performance, associative learning, and hippocampal neurogenesis in mice. *PLoS One* **5**: e11130.

Marco EM, Macri S, Laviola G (2011). Critical age windows for neurodevelopmental psychiatric disorders: evidence from animal models. *Neurotox Res* **19**: 286–307.

Marinelli M, Piazza PV (2002). Interaction between glucocorticoid hormones, stress and psychostimulant drugs. *Eur J Neurosci* **16**: 387–394.

McLaughlin JP, Li S, Valdez J, Chavkin TA, Chavkin C (2006). Social defeat stress-induced behavioral responses are mediated by the endogenous kappa opioid system. *Neuropsychopharmacology* **31**: 1241–1248.

McLaughlin JP, Marton-Popovici M, Chavkin C (2003). Kappa opioid receptor antagonism and prodynorphin gene disruption block stress-induced behavioral responses. *J Neurosci* **23**: 5674–5683.

Munn E, Bunning M, Prada S, Bohlen M, Crabbe JC, Wahlsten D (2011). Reversed light-dark cycle and cage enrichment effects on ethanol-induced deficits in motor coordination assessed in inbred mouse strains with a compact battery of refined tests. *Behav Brain Res* **224**: 259–271.

Nithianantharajah J, Hannan AJ (2009). The neurobiology of brain and cognitive reserve: Mental and physical activity as modulators of brain disorders. *Prog Neurobiol* **89**: 369–382.

Pietropaolo S, Feldon J, Alleva E, Cirulli F, Yee BK (2006). The role of voluntary exercise in enriched rearing: a behavioral analysis. *Behav Neurosci* **120**: 787–803.

Rosenzweig MR, Bennett EL (1996). Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. *Behav Brain Res* **78**: 57–65.

Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S *et al* (2003). Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* **301**: 805–809.

Shalev U, Erb S, Shaham Y (2010). Role of CRF and other neuropeptides in stress-induced reinstatement of drug seeking. *Brain Res* **1314**: 15–28.

Sinha R (2001). How does stress increase risk of drug abuse and relapse? *Psychopharmacology (Berl)* **158**: 343–359.

Solinas M, Chauvet C, Thiriet N, El Rawas R, Jaber M (2008). Reversal of cocaine addiction by environmental enrichment. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 17145–17150.

Solinas M, Thiriet N, Chauvet C, Jaber M (2010). Prevention and treatment of drug addiction by environmental enrichment. *Prog Neurobiol* **92**: 572–592.

Solinas M, Thiriet N, El Rawas R, Lardeux V, Jaber M (2009). Environmental enrichment during early stages of life reduces the behavioral, neurochemical, and molecular effects of cocaine. *Neuropsychopharmacology* **34**: 1102–1111.

Spear LP (2000). The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev* **24**: 417–463.

Stairs DJ, Bardo MT (2009). Neurobehavioral effects of environmental enrichment and drug abuse vulnerability. *Pharmacol Biochem Behav* **92**: 377–382.

Stairs DJ, Klein ED, Bardo MT (2006). Effects of environmental enrichment on extinction and reinstatement of amphetamine self-administration and sucrose-maintained responding. *Behav Pharmacol* **17**: 597–604.

Stern CM, Luoma JI, Meitzen J, Mermelstein PG (2011). Corticotropin releasing factor-induced CREB activation in striatal neurons occurs via a novel Gbetagamma signaling pathway. *PLoS One* **6**: e18114.

Surget A, Saxe M, Leman S, Ibarguen-Vargas Y, Chalon S, Griebel G *et al* (2008). Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal. *Biol Psychiatry* **64**: 293–301.

Swadi H (1999). Individual risk factors for adolescent substance use. *Drug Alcohol Depend* **55**: 209–224.

Sztainberg Y, Kuperman Y, Tsoory M, Lebow M, Chen A (2010). The anxiolytic effect of environmental enrichment is mediated via amygdalar CRF receptor type 1. *Mol Psychiatry* **15**: 905–917.

Thiriet N, Amar L, Toussay X, Lardeux V, Ladenheim B, Becker KG *et al* (2008). Environmental enrichment during adolescence regulates gene expression in the striatum of mice. *Brain Res* **1222**: 31–41.

Thiriet N, Gennequin B, Lardeux V, Chauvet C, Decressac M, Janet T *et al* (2011). Environmental enrichment does not reduce the rewarding and neurotoxic effects of methamphetamine. *Neurotox Res* **19**: 172–182.

van der Veen R, Piazza PV, Deroche-Gamonet V (2007). Gene-environment interactions in vulnerability to cocaine intravenous self-administration: a brief social experience affects intake in DBA/2J but not in C57BL/6J mice. *Psychopharmacology* **193**: 179–186.

Xu Z, Hou B, Gao Y, He F, Zhang C (2007). Effects of enriched environment on morphine-induced reward in mice. *Exp Neurol* **204**: 714–719.

Supplementary Information accompanies the paper on the Neuropsychopharmacology website (http://www.nature.com/npp)

Article 3: Modulation of the Endocannabinoid System prevents Methamphetamine-induced neurotoxicity in mice

Nader J., Rapino C., Gennequin B., François A., Francheteau M., Makryiannis A., Maccarrone M., Solinas M., Thiriet N.

(en cours de préparation)

La METH est l'un des psychostimulants les plus consommés dans le monde, en raison de son coût faible et de la longue durée de ses effets (Krasnova et Cadet, 2009). En comparaison aux autres psychostimulants, la METH induit une forte toxicité neuronale *(cf. chapitre 1)*. En effet, des études d'imagerie cérébrale ont montré une diminution du taux des marqueurs dopaminergiques chez des usagers de METH (Wilson et al, 1996 ; McCann et al, 1998 ; Volkow et al, 2001b). De plus, des études précliniques ont montré que les animaux ayant été exposés à la METH présentent une dégénérescence des terminaisons dopaminergiques dans le striatum et le cortex (Wagner et al, 1980 ; Ricaurte et al, 1982 ; Schmidt et al, 1985 ; O'Callaghan et Miller, 1994). Par ailleurs, plusieurs propriétés neuroprotectives ont déjà été suggérées pour le SCE, notamment dans le cadre de lésions cérébrales et de maladies neurodégénératives (Melis et al, 2006 ; Garcia-Arencibia et al, 2007) *(cf. chapitre 3)*. De plus, les ECs ont la capacité de moduler des mécanismes, comme l'excitotoxicité (Marsicano et al, 2003), l'inflammation (pour revue (Cabral et al, 2008)) et la neurotransmission (pour revue (Schlicker et Kauthmann, 2001)), toutes trois impliquées dans la neurotoxicité induite par la METH *(cf. chapitre 1)*.

Ainsi, nous avons recherché si la stimulation pharmacologique du SCE permet de protéger contre la toxicité induite par la METH. Dans un premier temps, nous avons mesuré, en collaboration avec l'équipe du Pr M. Maccarrone (Université de Teramo, Italie), le taux striatal d'anandamide et de 2-AG suite à l'administration de la METH (30mg/kg, i.p.). Nous

avons montré que la METH induit des changements rapides du taux de ces endocannabinoides dans le striatum. Dans un deuxième temps, nous avons stimulé pharmacologiquement le SCE, avant l'administration de la METH, en utilisant le THC (3mg/kg), l'URB597 (1mg/kg) ou le JZL184 (1mg/kg), le premier étant un agoniste direct des récepteurs cannabinoïdes et les deux autres des inhibiteurs des enzymes de dégradation des ECs. Nous avons alors observé que la stimulation du SCE avant l'administration de la METH, protège contre la perte de TH induite par la drogue. Enfin, en utilisant des antagonistes des récepteurs CB1 ou CB2, nous avons montré que la neuroprotection induite par le SCE est dépendante de l'activation des récepteurs CB2.

Ainsi donc, nos résultats soulignent l'importance du SCE en tant que système protecteur contre les processus neurotoxiques déclenchés par la METH, et constituent un argument en faveur du rôle protecteur des récepteurs CB2 contre les processus neurodégénératifs.

Modulation of the endocannabinoid system prevents Methamphetamine-induced neurotoxicity in mice.

Joëlle Nader[1,2], Cinzia Rapino[3], Benjamin Gennequin[1,2], Arnaud François[2,4], Maureen Francheteau[1,4], Alexandros Makryiannis[5], Mauro Maccarrone[3], Marcello Solinas[1,2], Nathalie Thiriet[1,2]

[1]INSERM U-1084, Experimental and Clinical Neurosciences Laboratory, Poitiers – FRANCE

[2] University of Poitiers, Poitiers – FRANCE

[3]Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Teramo, Teramo, Italy

[4]EA 3808, Cibles moléculaires et Thérapeutique de la maladie d'Alzheimer, Poitiers – FRANCE

[5] Northeastern University, Boston, USA

Introduction

Methamphetamine (METH), a substituted amphetamine, is one of the most abused psychostimulants around the world due to its inexpensive production and long duration of action (Krasnova and Cadet, 2009). Its chronic use is often associated with cognitive impairments such as deficits in attention, working memory and decision-making (Simon et al., 2000; Volkow et al., 2001c; Chang et al., 2002; Johanson et al., 2006). Structural magnetic resonance imaging (MRI) studies have shown that recurrent use of high doses of METH induces persistent morphological changes in brain regions implicated in mood regulation such as the prefrontal cortex, the hippocampus and the striatum (Volkow et al., 2001a-b; Chang et al., 2005; Barr et al., 2006). For example, Thompson et al. observed a loss of gray matter in the cingulate, limbic and paralimbic cortices, and a shrinkage of the hippocampus in chronic METH users (Thompson et al., 2004). Also post-mortem and brain imaging studies have shown that long-term use of METH induces specific damages for the dopaminergic neurotransmitter system, such as a reduction of dopamine (DA) levels, as well as a decreased level of dopamine transporter (DAT) and tyrosine hydroxylase (TH), a key step in the DA synthesis (Wilson et al., 1996; McCann et al., 1998; Volkow et al., 2001c). In agreement with clinical observations, preclinical studies showed that animals exposed to METH present a degeneration of DA nerve terminals, which is shown by a reduction in TH activity, DAT activity and vesicular monoamine transporter-2 protein level in the striatum and cortex (Wagner et al., 1980; Ricaurte et al., 1982; Schmidt et al., 1985; O'Callaghan and Miller, 1994; Fumagalli et al., 1998; Hanson et al., 1998; Kokoshka et al., 1998). In addition to the loss of monoaminergic terminals, METH treatment causes death of neuronal cell bodies

in the striatum of rodents (Ryan et al., 1990; Cadet et al., 2003; Jayanthi et al., 2005), accompanied by microglial activation (Pubill et al., 2002; LaVoie et al., 2004).

The endocannabinoid system is a neuromodulatory system, involving two main ligands, namely N-arachidonoylethanolamine (anandamide, AEA) (Devane et al., 1992) and 2-arachidonoyl glycerol (2-AG) (Mechoulam et al., 1995). The endocannabinoids (ECs) are synthesized from lipid precursors, released "on demand" by stimulated cells (Mechoulam et al., 1998) and inactivated in a two-step process: transportation into neurons (Mechoulam et al., 1998; Glaser et al., 2005), and inactivation by specific enzymes fatty acid amide hydrolase (FAAH) and monoacylglycerol lipase (MGL) for AEA and 2-AG, respectively (Mechoulam et al., 1998; Piomelli, 2003). ECs binds mainly to two receptors coupled to G-protein (Mechoulam et al., 1998; Solinas et al., 2008; Campos et al., 2010), namely CB1 (Matsuda et al., 1990) and CB2 (Munro et al., 1993). The CB1 receptor appears to be largely expressed in areas of the brain involved in movement control, learning, memory, reward and emotions such as the striatum, the hippocampus, the amygdaloid nucleus and the substantia nigra (Herkenham et al., 1991; Moldrich and Wenger, 2000; Freund et al., 2003). Until recently, CB2 receptors were thought to have mainly a peripheral expression but new studies have demonstrated that functional CB2 receptors are also in the brain (Van Sickle et al., 2005; Gong et al., 2006; Onaivi et al., 2006).

Recent converging evidence suggests that the ECS plays a neuroprotective role in several pathological situations such as ischemia and Parkinson's disease (Melis et al., 2006; Garcia-Arencibia et al., 2007; Fernandez-Ruiz, 2009). For example, it has been reported that the administration of exogenous cannabinoids (THC or cannabidiol) to rats helps reducing the dopaminergic toxicity induced by a 6-OHDA lesion (Lastres-Becker et al., 2005), and the

administration of the selective CB1 agonist WIN-55,212 protected rat brain against ischemia (Nagayama et al., 1999; Melis et al., 2006). This neuroprotection seems to be due, at least in part, to the ability of ECS to antagonize mechanisms that participate in neurodegeneration. Indeed, cannabinoids were shown to protect neurons via an antioxidant activity (Hampson et al., 1998), the inhibition of glutamate excitotoxicity (Shen and Thayer, 1998) and the suppression of the formation of tumor necrosis factor (Gallily et al., 2000).

Taking into account this potential neuroprotective role of the ECS against brain diseases, we undertook this study to investigate whether the ECS respond to a toxic regimen of METH and whether the activation of ECS would reduce METH-induced neurotoxicity.

Results

METH treatment regulates EC levels in the striatum

In order to evaluate the impact of METH treatment on the levels of ECs in the striatum of mice, we measured AEA and 2-AG levels at different time points after METH treatment (30 mg/kg) using a liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. We found that AEA levels were significantly increased, in the striatum, 1h and 12h after METH injection ($p<0.05$) (Fig. 1a), while 2-AG levels were reduced 12h after the drug injection ($p<0.05$) (Fig. 1b).

Δ^9-THC prevents METH-induced reduction of TH levels in the striatum.

To evaluate the protective role of the ECS, mice were treated with the natural cannabinoid agonist, Δ^9-tetrahydrocannabinol (THC; 3mg/kg) 30 min before METH (30mg/kg) injection. Seven days after drugs' injections, we measured TH levels in the striatum (Fig. 2). TH levels of METH-treated mice were significantly reduced (30% loss) when compared to vehicle-treated animals ($p<0.001$), which indicates that METH is toxic to DA neurotransmission within the striatum. In contrast, METH-treated mice treated with THC showed TH levels similar to saline-treated mice and significantly higher than that of mice that received METH alone ($p<0.05$), indicating that THC pretreatment blocked METH-induced toxicity in the striatum.

Enhancement of the endogenous ECS tone prevents METH-induced reduction of TH levels in the striatum.

THC is the main active ingredient in Cannabis and its administration produces rewarding effects in nonhuman primates (Tanda et al., 2000; Justinova et al., 2003). Because of abuse liability, the possibility of using THC in clinical settings is limited. Therefore, we investigated whether indirect cannabinoid agonists that activate the ECS but are devoid of addictive properties (Gobbi et al., 2005; Justinova et al., 2008), could also reduce METH induce toxicity. First, we used URB597, an inhibitor of FAAH enzymes that increases the levels of AEA (Kathuria et al., 2003). In order to determine the lowest dose of URB597 effective in preventing METH-induced loss of striatal TH, groups of mice received different doses of URB597 (Fig. 3). Again, TH levels of METH-treated animals were significantly reduced when compared to vehicle group ($p<0.001$). In contrast, URB597 at the dose of 1mg/kg, but 0.1 or 0.3 mg/kg, pretreatment prevented DA levels decrease and mice showed similar TH levels than vehicle-treated animals indicating that at this dose, URB597 prevents METH-induced striatal dopaminergic loss.

We then used JZL184, an inhibitor of MGL enzymes that increases the levels of 2-AG (Long et al., 2009). 40 min before METH treatment, JZL184 was injected at a dose of 16mg/kg that has been shown to produce significant increase in 2-AG and to be effective in mice (Long et al., 2009) (Fig. 4). We found that JZL184 prevented METH-induced striatal dopaminergic loss and mice pretreated with JZL 184 showed levels of TH similar to those of vehicle-treated animals.

CB2 but not CB1 receptors mediate the protective effects of URB597 against METH-induced toxicity.

In order to identify the receptor subtype involved in URB597 prevention of the loss of striatal TH, we blocked CB receptors using selective CB1 (SR141716A) and CB2 (AM630) antagonists at the dose of 1mg/kg (i.p.) before URB and METH injections (Fig.5). Mice were given one of the two antagonists 1h before METH injection (20 min before URB597 administration). Blocking CB1 receptors did not abolish the preventive effect of URB597 ($p>0.05$) while in mice administered with CB2 antagonist the protective effects of URB 597 were abolished ($p<0.05$ when compared to Vehicle-treated group), suggesting that the preventive effect of URB597 is mediated by CB2 receptors.

Discussion

In this study, we found that stimulation of the ECS has protective effects against METH neurotoxicity. As a matter of fact, administration of a toxic dose of METH alters the striatal levels of ECS ligands and direct or indirect stimulation of the ECS prevents the reduction of dopaminergic markers in the striatum. In addition, it appears that the effects of ECS agonists are mediated by CB2, but not CB1, receptors. Stimulation of the ECS may represent a potential treatment to prevent the toxic effects of psychostimulants.

In this study, we found that administration of a toxic 30 mg/kg of METH altered striatal levels of endogenous cannabinoid in a time dependent manner. In particular, METH administration increased AEA striatal levels 1 and 12 h after the injection and these levels returned to basal levels 24 h after the injection. In contrast, levels of 2-AG were decreased 12h after METH administration and they also returned to basal levels 24 h after the injection. To the best of our knowledge, this is the first study investigating the effects of METH on the levels of ECs. Previous studies have investigated the effects of other drugs of abuse such as alcohol, morphine or cocaine on ECs levels and they used protocols of administration that were more suited for the investigation of sensitization, tolerance or withdrawal effects (Vigano et al., 2004; Solinas et al., 2008; Thiemann et al., 2008). Although direct comparison may be difficult, our results are consistent with previous findings showing that administration of drugs of abuse often increases the striatal levels of AEA and reduces the levels of 2-AG (Solinas et al., 2008; Thiemann et al., 2008).

An important question raised by these results is whether these changes in ECS ligands contribute to, oppose or have no effect on METH toxicity. We found that administration of

URB597, a FAAH inhibitor that increases brain levels of AEA (Kathuria et al., 2003), and administration of JZL184, an MGL inhibitor that increases brain levels (Solinas et al., 2008; Thiemann et al., 2008)of 2-AG (Long et al., 2009), decrease the toxic effects of METH on the DA system in the striatum, suggesting that increasing the endogenous tone of AEA and 2-AG opposes METH neurotoxicity. In the case of AEA, it could be speculated that toxic doses of METH induce a massive release of DA that, in turn, leads to the release of AEA (Giuffrida et al., 1999) which would act as retrograde signal (Wilson and Nicoll, 2001) and produce a negative feedback on DA release to limit damages that could be triggered by excessive DA oxidation and reactive oxygen species generation. Therefore, increases in AEA levels would represent one of brain mechanisms of protection from METH neurotoxicity. In the case of 2-AG, the profile of striatal changes and the effects of inhibition of 2-AG metabolic degradation suggest a different role for this endocannabinoid. In fact, administration of METH does not produce the rapid increase in 2-AG striatal levels that could be expected as a reaction to METH toxicity but rather a late decrease. Because 2-AG has been suggested to play a house-keeping role that is necessary for basal functioning and survival of the cell (Piomelli, 2003), it could be speculated that the decreases in 2-AG represent a sign of cell damage induced by METH. Whereas 2-AG release does not appear to represent a physiological response to METH administration, boosting 2-AG levels pharmacologically by administration of JZL184 leads to the reduction of METH-induced toxicity.

The preventive effects of the ECS against METH-induced toxicity appear to be mediated by CB2 receptors. In fact, direct stimulation of CB receptors by THC that binds to both CB1 and CB2 receptors (Bayewitch et al., 1996) produced a neuroprotective effects similar to those of URB587 and JZL184. On the other hand, the protective effects of URB597

were lost when CB2, but not CB1, receptors were blocked. Although until recently the presence and roles of CB2 receptors in the brain were considered limited, accumulating evidence suggest that especially under pathological conditions or in response to external insults, CB2 receptors modulate brain responses and activity (Onaivi et al., 2012). In particular, recent studies show that CB2 receptors reduce the neurotoxicity of MDMA (Torres et al., 2010; Tourino et al., 2010; Torres et al., 2011), a substituted amphetamine that produces toxicity in the brain with mechanisms that are in large part similar to those induced by METH (Quinton and Yamamoto, 2006). These results suggest that CB2 agonists may be beneficial in preventing the toxic consequence of METH overdose. However, recent studies showing that CB2 antagonists decrease the rewarding effects of drugs of abuse (Xi et al., 2011) may suggest that direct pharmacological stimulation of CB2 actually increase METH rewarding effects. For this reason, the use of indirect agonists, which increase the tone of endogenous cannabinoid and amplify their effects only where they are released (Piomelli, 2003; Di Marzo et al., 2004), may represent a more promising pharmacological treatment for drug abuse.

Several mechanisms could be responsible for the protective effects of the ECS on METH-induced toxicity. As stated earlier, one possibility is that endocannabinoids act as a retrograde signal and reduce presynaptic release of neurotransmitters such as DA or glutamate that are released after METH administration and participate to the METH-induced neurotoxic processes (Quinton and Yamamoto, 2006). However, although this mechanism has been clearly established for CB1 receptors, CB2 receptors appear to be located mostly postsynaptically rather than presynaptically (Brusco et al., 2008) and there is no evidence that they also play a role in retrograde signaling. Therefore, the fact that, in this study, CB2

and not CB1 receptors appear to play the major role in the protective effects of the ECS indicate that other mechanisms are likely to contribute to the protective effects of ECs.

In particular, reduction of inflammatory processes by stimulation of CB2 has been described for neurodegenerative diseases such as Parkinson and Huntington diseases (Fernandez-Ruiz et al., 2011). As a matter of fact, several studies have demonstrated the involvement of CB2 receptors in the progression or arrest of brain damage, by influencing events such as microglial cell migration at neuroinflammatory lesion sites (Walter et al., 2003; Fernandez-Ruiz et al., 2011). Such inflammatory processes are part of the METH-induced toxicity since the drug induces a microglial activation in dopaminergic regions such as the striatum (Sekine et al., 2008), which increases TNF-alpha production (Nakajima et al., 2004; Buchanan et al., 2010). On the other hand, THC reduces MDMA-induced microglial activation by acting on CB2 receptors (Tourino et al., 2010). These observations suggest that the activation of CB2 receptors expressed by microglial cells may modulate microglial response (Ashton and Glass, 2007), reduce the production of neurotoxic factors such as TNF-alpha, ROS and nitric oxide by theses reactive cells (Klegeris et al., 2003; Fernandez-Ruiz et al., 2007) and consequently, facilitate survival of neurons and prevent METH-induced neurotoxicity.

An additional mechanism independent from both CB1 and CB2 receptors that may participate in the protective effects of ECS is an anti-oxidant effect (Fernandez-Ruiz et al., 2011). In fact, the oxidation of DA massively released by METH (Sulzer et al., 1995), produces reactive species, such as superoxide radicals and hydrogen peroxide, that cause neurodegeneration of dopaminergic terminals in rodents striatum (Davidson et al., 2001; Cadet et al., 2003). THC and 2-AG have been shown to have antioxidant properties

(McCarron et al., 2003; Fernandez-Ruiz et al., 2011) and therefore they could reduce the METH-induced cellular damages by limiting the accumulation of reactive species.

Altogether the present results demonstrate that stimulation of ECS prevents METH-induced toxicity on DA terminals in the striatum mainly by activation of CB2, but not CB1, receptors. Whereas future investigations will be needed to determine the mechanisms responsible for these protective effects, our results highlight the importance of the ECS as a neuroprotective agent against neurotoxic processes induced by high doses of amphetamines. Moreover, because of the similarity in the mechanisms underlying METH-induced toxicity and neurodegenerative processes, this study provides support for the use of direct and indirect ECS agonists in the treatment of neurodegenerative diseases.

Materials & Methods

Animals

Adult male mice C57Bl/6J were housed in a temperature-controlled environment on a 12h light 12h dark cycle (light from 7 am till 7 pm). They were bred on-site and randomly housed in groups of four, directly after weaning (3 weeks of age). Mice were given free access to food and water. All experiments were conducted during the light period. Experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) for the care of laboratory animals.

Drugs and treatment

Mice received a single injection of METH (Research Triangle Institute) (30 mg/kg i.p.) or physiological saline. This dose of drug has been shown to produce apoptosis in striatal neurons of mice (Zhu et al., 2006b). The FAAH inhibitor URB597 (Covalab, France), the CB1 antagonist SR141716A (Rimonabant) (Research Triangle Institute) and the CB2 antagonist AM630 (synthetized at Northeastern University) were dissolved in a solution of 5% DMSO, 5% Tween-80 (Sigma, France) and 90% physiological saline (vehicle solution), and administered at 1mg/kg. The MGL inhibitor JZL184 (Interchim, France) was dissolved in a solution of 20% DMSO, 5% Tween-80 and 90% physiological saline, and administered at 16mg/kg. THC was dissolved in a solution of 5% ethanol, 5% Tween-80 and 90% physiological saline and given at 3mg/kg.

Experimental design

For the detection of ECS endogenous ligands, mice were treated with either METH (30mg/kg, i.p.) or physiological saline, and decapitated 1h, 6h, 12h or 24h after the treatment. Brains were removed and the striatum were dissected and sent to Teramo (Italy) in order to measure AEA and 2-AG levels.

For the study of the protective role of the ECS against METH-induced toxicity, mice were treated with the antagonists of the CB receptors or their vehicle 1h before receiving METH injection. The inhibitors of MGL and FAAH, or their vehicle, were administered 40 min before METH treatment. Δ^9-THC or its vehicle were administered 30 min before METH injection. Mice were decapitated 7 days after METH was administered. Brains were removed and the striatum were dissected in order to analyze TH levels by western blot.

Measurement of ECs levels

Brain tissues were subjected to lipid extraction with chloroform/methanol (2:1, v/v), in the presence of d_8-AEA and d_8-2-AG as internal standards. The organic phase was dried and then analyzed by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (LC–ESI-MS), using a single quadrupole API-150EX mass spectrometer (Applied Biosystem, CA, USA) in conjunction with a PerkinElmer LC system (PerkinElmer, MA, USA). Quantitative analysis was performed by selected ion recording over the respective sodiated molecular ions, as reported (Francavilla et al., 2009).

Western Blot Analysis

TH levels in the striatum were analyzed by Western Blot to evaluate DA terminals loss. Animals were sacrificed 7 days after drug treatment by decapitation. Brains were removed and brain regions dissected over ice, frozen on dry ice and stored at -80°C until western blot experiments. One hemi-striatum per animal was homogenized (350µl/25mg) in a buffer solution containing Tris-HCl 0.2M pH6.9, SDS 8%, glycerol 35%. Samples were then heated to 90°C for 3 min and centrifuged (10min at 13000g). Supernatants were analyzed using a DC protein assay kit (BioRad, France). Fifty mg of proteins per sample were loaded on a SDS-page gel. Gels were transferred to nitrocellulose membrane.

Membranes were blocked for 1h at room temperature (RT) in Tris-Buffered Saline (TBS) solution containing 3% Bovine Serum Albumin (BSA) and 0,1% of Tween-20. Membranes were then incubated with primary antibodies : mouse anti-TH antibody (1:5000) (Immunostar, France) and rabbit anti-Actin antibody (1:10000) (Sigma,France) diluted in the same buffer for 2h at RT. Several rinses were made (3x10min) with TBS containing 0,1% Tween-20 before 1h incubation at RT with secondary antibodies: goat anti-rabbit coupled to Alexa Fluor 488 and goat anti-mouse coupled to Alexa Fluor 568 (1:1000, Invitrogen, France) diluted in TBS containing 3% BSA and 0,1% Tween-20. Membranes were rinsed as described earlier and analyzed using Typhoon Imaging system (GE Healthcare). Image J software was used for quantification. TH signal was normalized to β-Actin signal in order to avoid any loading artifact.

Statistical Analysis

All results are presented as group means (± SEM). Differences between groups were assessed by ANOVA. Results showing significant differences were subjected to Student-Neuman-Keuls post-hoc test except for the data of the ECs levels that were subjected to a Dunnet's post-hoc test.

ACKNOWLEDGEMENTS.

This work was supported by the Institut National pour la Santé et la Recherche Médicale, le Centre National pour la Recherche Scientifique, University of Poitiers, and the Contrat de Projet Etat Region (CPER) #5. J. Nader is recipient of PhD fellowship by the French Minister of Research. We thank NIDA IRP for providing methamphetamine HCL.

References

Ashton JC, Glass M (2007) The cannabinoid CB2 receptor as a target for inflammation-dependent neurodegeneration. Curr Neuropharmacol 5:73-80.

Barr AM, Panenka WJ, MacEwan GW, Thornton AE, Lang DJ, Honer WG, Lecomte T (2006) The need for speed: an update on methamphetamine addiction. J Psychiatry Neurosci 31:301-313.

Bayewitch M, Rhee MH, Avidor-Reiss T, Breuer A, Mechoulam R, Vogel Z (1996) (-)-Delta9-tetrahydrocannabinol antagonizes the peripheral cannabinoid receptor-mediated inhibition of adenylyl cyclase. J Biol Chem 271:9902-9905.

Brusco A, Tagliaferro P, Saez T, Onaivi ES (2008) Postsynaptic localization of CB2 cannabinoid receptors in the rat hippocampus. Synapse 62:944-949.

Buchanan JB, Sparkman NL, Johnson RW (2010) A neurotoxic regimen of methamphetamine exacerbates the febrile and neuroinflammatory response to a subsequent peripheral immune stimulus. J Neuroinflammation 7:82.

Cadet JL, Jayanthi S, Deng X (2003) Speed kills: cellular and molecular bases of methamphetamine-induced nerve terminal degeneration and neuronal apoptosis. FASEB J 17:1775-1788.

Campos AC, Ferreira FR, GuimarÃ£es FS, Lemos JI (2010) Facilitation of endocannabinoid effects in the ventral hippocampus modulates anxiety-like behaviors depending on previous stress experience. Neuroscience 167:238-246.

Chang L, Cloak C, Patterson K, Grob C, Miller EN, Ernst T (2005) Enlarged striatum in abstinent methamphetamine abusers: a possible compensatory response. Biol Psychiatry 57:967-974.

Chang L, Ernst T, Speck O, Patel H, DeSilva M, Leonido-Yee M, Miller EN (2002) Perfusion MRI and computerized cognitive test abnormalities in abstinent methamphetamine users. Psychiatry Res 114:65-79.

Davidson C, Gow AJ, Lee TH, Ellinwood EH (2001) Methamphetamine neurotoxicity: necrotic and apoptotic mechanisms and relevance to human abuse and treatment. Brain Res Brain Res Rev 36:1-22.

Devane WA, Breuer A, Sheskin T, JÃ¤rbe TU, Eisen MS, Mechoulam R (1992) A novel probe for the cannabinoid receptor. J Med Chem 35:2065-2069.

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

Fernandez-Ruiz J (2009) The endocannabinoid system as a target for the treatment of motor dysfunction. Br J Pharmacol 156:1029-1040.

Fernandez-Ruiz J, Romero J, Velasco G, Tolon RM, Ramos JA, Guzman M (2007) Cannabinoid CB2 receptor: a new target for controlling neural cell survival? Trends Pharmacol Sci 28:39-45.

Fernandez-Ruiz J, Moreno-Martet M, Rodriguez-Cueto C, Palomo-Garo C, Gomez-Canas M, Valdeolivas S, Guaza C, Romero J, Guzman M, Mechoulam R, Ramos JA (2011) Prospects for cannabinoid therapies in basal ganglia disorders. Br J Pharmacol 163:1365-1378.

Francavilla F, Battista N, Barbonetti A, Vassallo MR, Rapino C, Antonangelo C, Pasquariello N, Catanzaro G, Barboni B, Maccarrone M (2009) Characterization of the endocannabinoid system in human spermatozoa and involvement of transient receptor potential vanilloid 1 receptor in their fertilizing ability. Endocrinology 150:4692-4700.

Freund TF, Katona I, Piomelli D (2003) Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. Physiol Rev 83:1017-1066.

Fumagalli F, Gainetdinov RR, Valenzano KJ, Caron MG (1998) Role of dopamine transporter in methamphetamine-induced neurotoxicity: evidence from mice lacking the transporter. J Neurosci 18:4861-4869.

Gallily R, Breuer A, Mechoulam R (2000) 2-Arachidonylglycerol, an endogenous cannabinoid, inhibits tumor necrosis factor-alpha production in murine macrophages, and in mice. Eur J Pharmacol 406:R5-7.

Garcia-Arencibia M, Gonzalez S, de Lago E, Ramos JA, Mechoulam R, Fernandez-Ruiz J (2007) Evaluation of the neuroprotective effect of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: importance of antioxidant and cannabinoid receptor-independent properties. Brain Res 1134:162-170.

Giuffrida A, Parsons LH, Kerr TM, Rodriguez de Fonseca F, Navarro M, Piomelli D (1999) Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. Nat Neurosci 2:358-363.

Glaser ST, Kaczocha M, Deutsch DG (2005) Anandamide transport: a critical review. Life Sci 77:1584-1604.

Gobbi G, Bambico FR, Mangieri R, Bortolato M, Campolongo P, Solinas M, Cassano T, Morgese MG, Debonnel G, Duranti A, Tontini A, Tarzia G, Mor M, Trezza V, Goldberg SR, Cuomo V, Piomelli D (2005) Antidepressant-like activity and modulation of brain

monoaminergic transmission by blockade of anandamide hydrolysis. Proc Natl Acad Sci U S A 102:18620-18625.

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

Hampson AJ, Grimaldi M, Axelrod J, Wink D (1998) Cannabidiol and (-)Delta9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. Proc Natl Acad Sci U S A 95:8268-8273.

Hanson GR, Gibb JW, Metzger RR, Kokoshka JM, Fleckenstein AE (1998) Methamphetamine-induced rapid and reversible reduction in the activities of tryptophan hydroxylase and dopamine transporters: oxidative consequences? Ann N Y Acad Sci 844:103-107.

Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC (1991) Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. J Neurosci 11:563-583.

Jayanthi S, Deng X, Ladenheim B, McCoy MT, Cluster A, Cai NS, Cadet JL (2005) Calcineurin/NFAT-induced up-regulation of the Fas ligand/Fas death pathway is involved in methamphetamine-induced neuronal apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A 102:868-873.

Johanson CE, Frey KA, Lundahl LH, Keenan P, Lockhart N, Roll J, Galloway GP, Koeppe RA, Kilbourn MR, Robbins T, Schuster CR (2006) Cognitive function and nigrostriatal markers in abstinent methamphetamine abusers. Psychopharmacology (Berl) 185:327-338.

Justinova Z, Tanda G, Redhi GH, Goldberg SR (2003) Self-administration of delta9-tetrahydrocannabinol (THC) by drug naive squirrel monkeys. Psychopharmacology (Berl) 169:135-140.

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

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

Klegeris A, Bissonnette CJ, McGeer PL (2003) Reduction of human monocytic cell neurotoxicity and cytokine secretion by ligands of the cannabinoid-type CB2 receptor. Br J Pharmacol 139:775-786.

Kokoshka JM, Vaughan RA, Hanson GR, Fleckenstein AE (1998) Nature of methamphetamine-induced rapid and reversible changes in dopamine transporters. Eur J Pharmacol 361:269-275.

Krasnova IN, Cadet JL (2009) Methamphetamine toxicity and messengers of death. Brain Res Rev 60:379-407.

Lastres-Becker I, Molina-Holgado F, Ramos JA, Mechoulam R, Fernandez-Ruiz J (2005) Cannabinoids provide neuroprotection against 6-hydroxydopamine toxicity in vivo and in vitro: relevance to Parkinson's disease. Neurobiol Dis 19:96-107.

LaVoie MJ, Card JP, Hastings TG (2004) Microglial activation precedes dopamine terminal pathology in methamphetamine-induced neurotoxicity. Exp Neurol 187:47-57.

Long JZ, Li W, Booker L, Burston JJ, Kinsey SG, Schlosburg JE, Pavon FJ, Serrano AM, Selley DE, Parsons LH, Lichtman AH, Cravatt BF (2009) Selective blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis produces cannabinoid behavioral effects. Nat Chem Biol 5:37-44.

Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. Nature 346:561-564.

McCann UD, Wong DF, Yokoi F, Villemagne V, Dannals RF, Ricaurte GA (1998) Reduced striatal dopamine transporter density in abstinent methamphetamine and methcathinone users: evidence from positron emission tomography studies with [11C]WIN-35,428. J Neurosci 18:8417-8422.

McCarron RM, Shohami E, Panikashvili D, Chen Y, Golech S, Strasser A, Mechoulam R, Spatz M (2003) Antioxidant properties of the vasoactive endocannabinoid, 2-arachidonoyl glycerol (2-AG). Acta Neurochir Suppl 86:271-275.

Mechoulam R, Fride E, Di Marzo V (1998) Endocannabinoids. Eur J Pharmacol 359:1-18.

Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. Biochem Pharmacol 50:83-90.

Melis M, Pillolla G, Bisogno T, Minassi A, Petrosino S, Perra S, Muntoni AL, Lutz B, Gessa GL, Marsicano G, Di Marzo V, Pistis M (2006) Protective activation of the endocannabinoid system during ischemia in dopamine neurons. Neurobiol Dis 24:15-27.

Moldrich G, Wenger T (2000) Localization of the CB1 cannabinoid receptor in the rat brain. An immunohistochemical study. Peptides 21:1735-1742.

Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. Nature 365:61-65.

Nagayama T, Sinor AD, Simon RP, Chen J, Graham SH, Jin K, Greenberg DA (1999) Cannabinoids and neuroprotection in global and focal cerebral ischemia and in neuronal cultures. J Neurosci 19:2987-2995.

Nakajima A, Yamada K, Nagai T, Uchiyama T, Miyamoto Y, Mamiya T, He J, Nitta A, Mizuno M, Tran MH, Seto A, Yoshimura M, Kitaichi K, Hasegawa T, Saito K, Yamada Y, Seishima M, Sekikawa K, Kim HC, Nabeshima T (2004) Role of tumor necrosis factor-alpha in methamphetamine-induced drug dependence and neurotoxicity. J Neurosci 24:2212-2225.

O'Callaghan JP, Miller DB (1994) Neurotoxicity profiles of substituted amphetamines in the C57BL/6J mouse. J Pharmacol Exp Ther 270:741-751.

Onaivi ES, Ishiguro H, Gu S, Liu QR (2012) CNS effects of CB2 cannabinoid receptors: beyond neuro-immuno-cannabinoid activity. J Psychopharmacol 26:92-103.

Onaivi ES, Ishiguro H, Gong JP, Patel S, Perchuk A, Meozzi PA, Myers L, Mora Z, Tagliaferro P, Gardner E, Brusco A, Akinshola BE, Liu QR, Hope B, Iwasaki S, Arinami T, Teasenfitz L, Uhl GR (2006) Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. Ann N Y Acad Sci 1074:514-536.

Piomelli D (2003) The molecular logic of endocannabinoid signalling. Nat Rev Neurosci 4:873-884.

Pubill D, Verdaguer E, Sureda FX, Camins A, Pallas M, Camarasa J, Escubedo E (2002) Carnosine prevents methamphetamine-induced gliosis but not dopamine terminal loss in rats. Eur J Pharmacol 448:165-168.

Quinton MS, Yamamoto BK (2006) Causes and consequences of methamphetamine and MDMA toxicity. AAPS J 8:E337-347.

Ricaurte GA, Guillery RW, Seiden LS, Schuster CR, Moore RY (1982) Dopamine nerve terminal degeneration produced by high doses of methylamphetamine in the rat brain. Brain Res 235:93-103.

Ryan LJ, Linder JC, Martone ME, Groves PM (1990) Histological and ultrastructural evidence that D-amphetamine causes degeneration in neostriatum and frontal cortex of rats. Brain Res 518:67-77.

Schmidt CJ, Sonsalla PK, Hanson GR, Peat MA, Gibb JW (1985) Methamphetamine-induced depression of monoamine synthesis in the rat: development of tolerance. J Neurochem 44:852-855.

Sekine Y, Ouchi Y, Sugihara G, Takei N, Yoshikawa E, Nakamura K, Iwata Y, Tsuchiya KJ, Suda S, Suzuki K, Kawai M, Takebayashi K, Yamamoto S, Matsuzaki H, Ueki T, Mori N, Gold MS, Cadet JL (2008) Methamphetamine causes microglial activation in the brains of human abusers. J Neurosci 28:5756-5761.

Shen M, Thayer SA (1998) Cannabinoid receptor agonists protect cultured rat hippocampal neurons from excitotoxicity. Mol Pharmacol 54:459-462.

Simon SL, Domier C, Carnell J, Brethen P, Rawson R, Ling W (2000) Cognitive impairment in individuals currently using methamphetamine. Am J Addict 9:222-231.

Solinas M, Goldberg SR, Piomelli D (2008) The endocannabinoid system in brain reward processes. Br J Pharmacol 154:369-383.

Sulzer D, Chen TK, Lau YY, Kristensen H, Rayport S, Ewing A (1995) Amphetamine redistributes dopamine from synaptic vesicles to the cytosol and promotes reverse transport. J Neurosci 15:4102-4108.

Tanda G, Munzar P, Goldberg SR (2000) Self-administration behavior is maintained by the psychoactive ingredient of marijuana in squirrel monkeys. Nat Neurosci 3:1073-1074.

Thiemann G, van der Stelt M, Petrosino S, Molleman A, Di Marzo V, Hasenohrl RU (2008) The role of the CB1 cannabinoid receptor and its endogenous ligands, anandamide and 2-arachidonoylglycerol, in amphetamine-induced behavioural sensitization. Behav Brain Res 187:289-296.

Thompson PM, Hayashi KM, Simon SL, Geaga JA, Hong MS, Sui Y, Lee JY, Toga AW, Ling W, London ED (2004) Structural abnormalities in the brains of human subjects who use methamphetamine. J Neurosci 24:6028-6036.

Torres E, Gutierrez-Lopez MD, Mayado A, Rubio A, O'Shea E, Colado MI (2011) Changes in interleukin-1 signal modulators induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA): regulation by CB2 receptors and implications for neurotoxicity. J Neuroinflammation 8:53.

Torres E, Gutierrez-Lopez MD, Borcel E, Peraile I, Mayado A, O'Shea E, Colado MI (2010) Evidence that MDMA ('ecstasy') increases cannabinoid CB2 receptor expression in microglial cells: role in the neuroinflammatory response in rat brain. J Neurochem 113:67-78.

Tourino C, Zimmer A, Valverde O (2010) THC Prevents MDMA Neurotoxicity in Mice. PLoS One 5:e9143.

Van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, Mouihate A, Urbani P, Mackie K, Stella N, Makriyannis A, Piomelli D, Davison JS, Marnett LJ, Di Marzo V, Pittman QJ, Patel KD, Sharkey KA

(2005) Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. Science 310:329-332.

Vigano D, Valenti M, Cascio MG, Di Marzo V, Parolaro D, Rubino T (2004) Changes in endocannabinoid levels in a rat model of behavioural sensitization to morphine. Eur J Neurosci 20:1849-1857.

Volkow ND, Chang L, Wang GJ, Fowler JS, Ding YS, Sedler M, Logan J, Franceschi D, Gatley J, Hitzemann R, Gifford A, Wong C, Pappas N (2001a) Low level of brain dopamine D2 receptors in methamphetamine abusers: association with metabolism in the orbitofrontal cortex. Am J Psychiatry 158:2015-2021.

Volkow ND, Chang L, Wang GJ, Fowler JS, Leonido-Yee M, Franceschi D, Sedler MJ, Gatley SJ, Hitzemann R, Ding YS, Logan J, Wong C, Miller EN (2001c) Association of dopamine transporter reduction with psychomotor impairment in methamphetamine abusers. Am J Psychiatry 158:377-382.

Wagner GC, Ricaurte GA, Seiden LS, Schuster CR, Miller RJ, Westley J (1980) Long-lasting depletions of striatal dopamine and loss of dopamine uptake sites following repeated administration of methamphetamine. Brain Res 181:151-160.

Walter L, Franklin A, Witting A, Wade C, Xie Y, Kunos G, Mackie K, Stella N (2003) Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. J Neurosci 23:1398-1405.

Wilson JM, Kalasinsky KS, Levey AI, Bergeron C, Reiber G, Anthony RM, Schmunk GA, Shannak K, Haycock JW, Kish SJ (1996) Striatal dopamine nerve terminal markers in human, chronic methamphetamine users. Nat Med 2:699-703.

Wilson RI, Nicoll RA (2001) Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. Nature 410:588-592.

Xi ZX, Peng XQ, Li X, Song R, Zhang HY, Liu QR, Yang HJ, Bi GH, Li J, Gardner EL (2011) Brain cannabinoid CB(2) receptors modulate cocaine's actions in mice. Nat Neurosci 14:1160-1166.

Zhu JP, Xu W, Angulo N, Angulo JA (2006b) Methamphetamine-induced striatal apoptosis in the mouse brain: comparison of a binge to an acute bolus drug administration. Neurotoxicology 27:131-136.

Figure Legends

Fig.1 The effects of METH treatment (30mg/kg) on AEA (a) and 2-AG (b) levels in the striatum at different time point. METH induced modifications were investigated 1h, 6h, 12h and 24h after the drug was injected. Data are expressed as mean ± SEM (n=9 mice per group). *p<0.05 when compared with Vehicle-treated group.

Fig.2 Δ^9-THC prevents METH-induced reduction of TH levels in the striatum. (a) Graphical representation and (b) representative immunoblots of levels of Tyrosine Hydroxylase (TH) in the striatum of mice treated with Δ^9-THC (3mg/kg) or its vehicle. 30 minutes later mice received an injection of Methamphetamine-HCl (Meth; 30mg/kg) or its vehicle (NaCl 0.9%). Data are expressed as means ± SEM (n=8 mice per group). ***p<0.001 when compared with Vehicle-treated group. #p<0.05 when compared with METH-treated group.

Fig.3 URB597, at 1mg/kg, prevents METH-induced reduction of TH levels in the striatum. (a) Graphical representation and (b) representative immunoblots of levels of Tyrosine Hydroxylase (TH) in the striatum of mice treated with different doses of URB597 (0.1mg/kg, 0.3mg/kg, 1mg/kg) or its vehicle. 40 minutes later mice received an injection of Methamphetamine-HCl (30mg/kg) or its vehicle (NaCl 0.9%). Data are expressed as means ± SEM (n=8 mice per group). ***p<0.001 when compared to Veh-treated group; ###p<0.001 when compared to Veh-Meth treated group.

Fig.4 JZL184 prevents METH-induced reduction of TH levels in the striatum. (a) Graphical representation and (b) representative immunoblots of levels of Tyrosine Hydroxylase (TH) in the striatum of mice treated with JZL184 (1mg/kg) or its vehicle. 40 minutes later mice received an injection of Methamphetamine-HCl (Meth; 30mg/kg) or its vehicle (NaCl 0.9%). Data are expressed as means ± SEM (n=8 mice per group). *p<0.005 when compared with other groups.

Fig.5 The preventive effect of URB597 is mediated by CB2 but not CB1 activation. (a) Graphical representation and (b) representative immunoblots of levels of Tyrosine Hydroxylase (TH) in the striatum of mice treated with METH (30mg/kg, i.p.), URB597 (1mg/kg, i.p.) and CB1 (SR141716A) or CB2 (AM630) (1mg/kg, i.p.) antagonists injected 1h before URB injection. Data are expressed as means ± SEM (n=8 mice per group). *p<0.05 when compared to Vehicle-treated group.

Figure 1

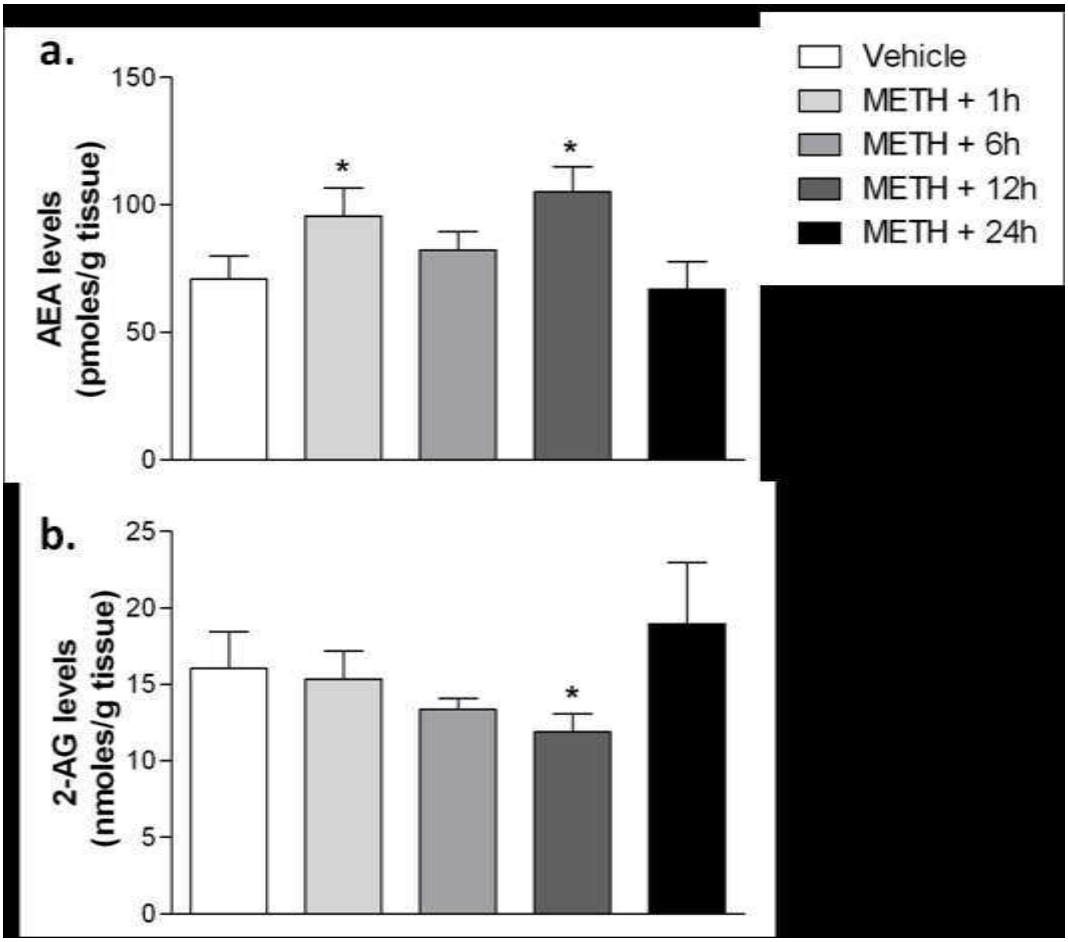

a.
AEA levels
(pmoles/g tissue)
150
100
50
0
*
*
Vehicle
METH + 1h
METH + 6h
METH + 12h
METH + 24h
b.
2-AG levels
(nmoles/g tissue)
25
20
15
10
5
0
*

Figure 2

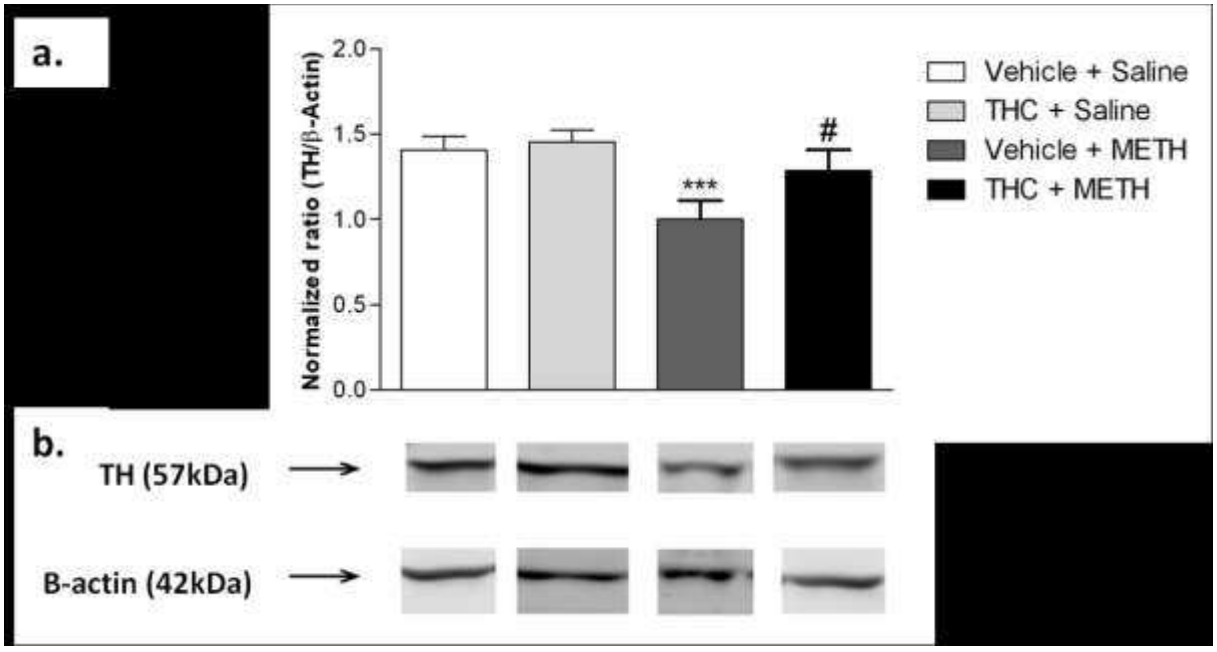


Figure 3

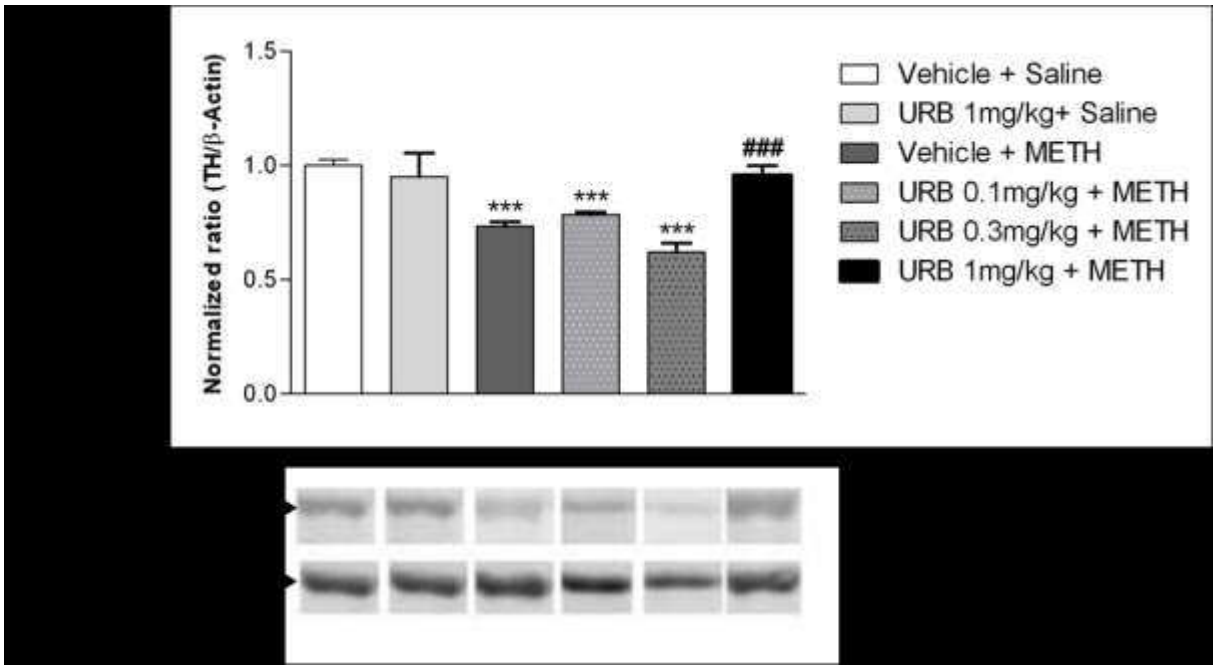


Figure 4

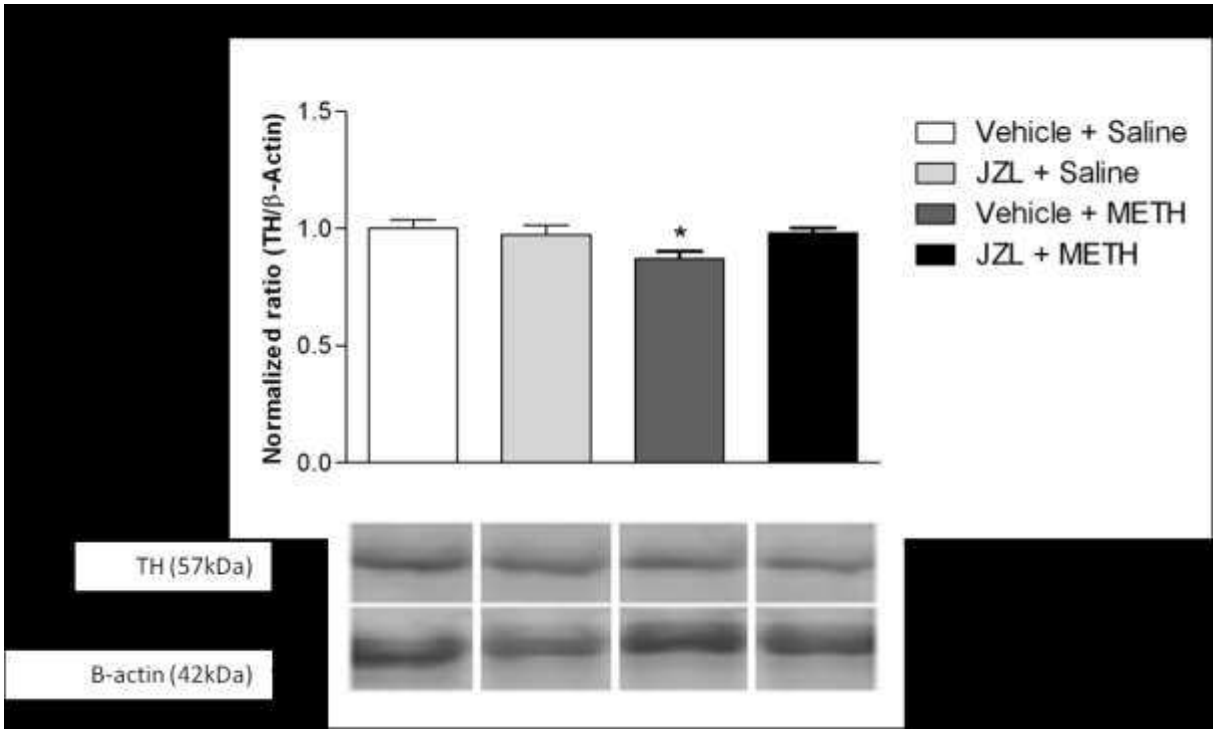
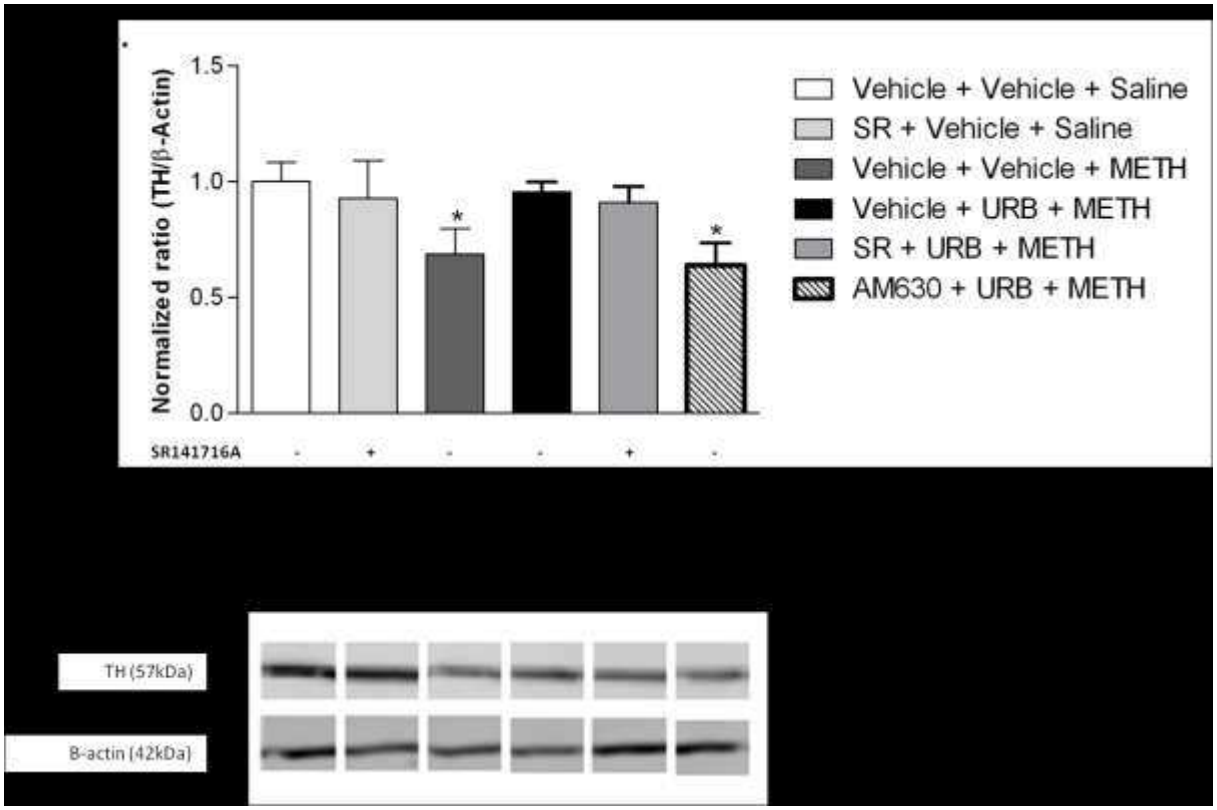


Figure 5



Discussion

A- Manipulation environnementale et dépendance

1. L'exposition à un EE protège contre l'addiction aux drogues d'abus

Plusieurs arguments suggèrent que les facteurs environnementaux réguleraient, de façon importante, la mise en place de la dépendance aux drogues d'abus chez l'Homme (Piazza et Le Moal, 1996). En effet, les expériences, positives ou négatives, auxquelles sont confrontés les individus tout au long de la vie, font que tous ne réagissent pas de la même manière face aux drogues d'abus *(cf. chapitre 2)*. En conséquence, parmi toutes les personnes qui expérimentent les drogues, il apparaît que seul 15 à 20 % deviendrait dépendants (Piazza et Le Moal, 1996).

Au cours de ces dernières années, des études précliniques, notamment dans notre laboratoire, ont permis d'avancer des arguments en faveur d'un effet bénéfique de l'exposition à un EE, qui procure des conditions de vie stimulantes, contre l'addiction aux drogues (pour revue Solinas et al., 2010). Cependant, dans la majorité des expériences qui ont permis de valider l'effet protecteur de l'exposition à un EE, les animaux étaient exposés à un EE de façon continue, comme c'est le cas dans nos études où les animaux sont exposés à l'EE pendant deux mois depuis le sevrage (âge 3 semaines) (Solinas et al, 2009). Nous nous sommes alors demandé si, dans le cas d'une perte des conditions stimulantes, les effets bénéfiques de l'EE sont maintenus. En effet, des études réalisées dans le cadre de maladies neurodégénératives ont montré que l'exposition à un EE créerait une « réserve cognitive », qui retarderait la mise en place des symptômes associés à ces pathologies (pour revue (Nithianantharajah et Hannan, 2009)). Notre question était donc de savoir si dans le cadre de l'addiction aux drogues, l'exposition à un EE procure une « réserve », qui permettrait de protéger l'individu malgré l'interruption de l'enrichissement environnemental.

Les résultats obtenus pendant ma thèse montrent que le changement de conditions environnementales d'un EE vers un SE induit, non seulement une perte rapide de l'effet préventif de l'EE, mais également une augmentation de la vulnérabilité aux effets

récompensants de la cocaïne (Article 2). Ainsi, le passage de conditions de vie perçues comme positives vers des conditions de vie perçues comme moins favorables favorise le développement de la dépendance aux drogues. Ces résultats indiquent que, par rapport à l'addiction, le concept de « réserve » à dépenser contre les effets des drogues produit par l'EE n'est pas applicable. A notre avis, cela ne remet pas en cause l'existence d'une telle réserve cognitive, déjà démontrée pour d'autres pathologies, mais montre que d'autres phénomènes, de l'ordre émotionnel plutôt que cognitif, sont fondamentaux dans les effets bénéfiques de l'EE sur l'addiction. De plus, d'un point de vue translationnel, ces résultats mettent en évidence la complexité des conséquences des expériences de vie, vécues par l'individu à un âge précoce, sur la dépendance aux drogues. En fait, il apparaît que l'exposition à un milieu enrichissant a des effets positifs seulement si elle est maintenue au cours de la vie. Par contre, si elle est interrompue au passage à l'âge adulte, les effets d'une exposition à l'EE peuvent se révéler néfastes. Ces résultats pourraient contribuer à expliquer la présence de cas d'addiction, surtout à la cocaïne, observés chez des individus qui appartiennent à des milieux classiquement considérés comme étant à faible risque car exposés à un entourage structuré et/ou un milieu aisé, etc.

2. La modulation du niveau de stress : un mécanisme sous-tendant l'impact des manipulations environnementales sur la dépendance aux drogues ?

Dans un article de revue, notre équipe a discuté plusieurs hypothèses quant aux mécanismes impliqués dans les effets protecteurs de l'EE (Solinas et al, 2010). Parmi ces hypothèses, nous avons proposé que l'exposition à un EE diminuerait le niveau de stress des individus, les rendant ainsi moins vulnérables à l'addiction. En effet, de nombreuses études ont montré que les niveaux de stress modulent la réactivité aux drogues. Chez l'Homme, l'exposition à des événements stressants, comme un manque de soutien social, favorise la prise de drogues, comme la cocaïne, la nicotine, le cannabis et l'alcool (Dembo et al, 1988 ; Wills et al, 1996 ; Sinha, 2001 ; Marinelli et Piazza, 2002). De plus, dans des modèles

animaux, il a été montré que l'exposition à un facteur stressant, comme la nage forcée, augmente la CPP induite par la cocaïne (Kreibich et al, 2009 ; McLaughlin et al, 2003), ainsi que la mise en place d'une dépendance aux drogues (Goeders, 2002 ; Marinelli et Piazza, 2002 ; Sinha, 2001 ; Koob et Le Moal, 2001 ; Kreek et al, 2005). Seulement une partie de mes travaux de thèse (article 1) constituent un argument direct en faveur de l'hypothèse selon laquelle l'effet bénéfique de l'EE serait lié à une diminution du niveau de stress des animaux.

i. L'exposition à un EE diminue le niveau d'anxiété

Dans le cadre de l'étude présentée dans l'article 1, nous avons mesuré, par le test de l'hypophagie induite par la nouveauté, les niveaux de stress des animaux exposés à un EE pendant deux mois. Ce test d'anxiété repose sur la mise en place d'un conflit entre la faim, qui pousse l'animal à aller vers la nourriture après une privation, et la peur de la nouveauté, qui l'empêcherait de s'aventurer dans un nouvel environnement (Santarelli et al, 2003). Nous avons alors observé une diminution du comportement anxieux des souris EE qui mettent moins de temps pour aller manger dans le dispositif que les souris SE. Ceci pourrait être interprété comme une anxiété réduite chez les souris EE, qui diminue le caractère aversif du dispositif. Cette diminution de l'état anxieux induite par l'exposition à un EE a déjà été montrée dans un dispositif d'exploration où les souris ont le choix de rester dans l'environnement familier ou d'aller vers le nouvel environnement : les souris élevées dans un EE présentent un comportement moins anxieux que celles élevées dans un SE avec, notamment, une diminution de la latence pour aller vers le nouvel environnement (Chapillon et al, 1999). Récemment, il a été observé une diminution du comportement anxieux chez les souris élevées en EE par rapport à celles élevées en SE, dans un test d'Open field (Stzainberg et al, 2010). Nos résultats confortent l'hypothèse d'un effet positif de l'EE contre le stress puisqu'il est opposé à ceux obtenus chez des animaux stressés chroniquement et de façon imprédictible (Surget et al, 2008 ; Tanti et al, 2012). Ainsi, ces résultats suggèrent que l'exposition à un EE rendrait les animaux moins vulnérables à l'addiction en diminuant leur niveau de stress.

ii. Le « switch » environnemental induit un état émotionnel négatif

Dans le cadre de l'étude présentée dans l'article 2, nous avons montré que l'augmentation de la vulnérabilité induite par le « switch » environnemental est associée à une augmentation du niveau de stress des souris. En effet, comparées aux autres groupes, les souris EE>SE présentent, notamment, une mise en place rapide d'un comportement de désespoir, mesuré par l'augmentation de l'immobilité dans le test de la nage forcée, et l'apparition d'un état anhédonique, mesuré par une diminution du comportement de toilettage dans le splash test. Quand elles passent d'un EE à un SE, les souris sont confrontées à un environnement pauvre et moins stimulant que celui auquel elles ont été habituées depuis le sevrage. Ce changement, perçu comme stressant et aversif, placerait les individus dans un état de stress, les rendant ainsi plus vulnérables aux propriétés récompensantes des drogues. Bien que cette étude ne nous a pas permis de mettre directement en évidence des effets anti-stress de l'EE, le profil comportemental associé au « switch » négatif EE>SE semble être compatible avec l'idée que la régulation induite par l'EE du niveau de stress et de l'état émotionnel de l'individu joue un rôle central dans ses effets préventifs contre l'addiction.

iii. Mécanismes régulés par les manipulations environnementales et potentiellement impliqués dans la modulation du niveau de stress des individus

a- Régulation du SCE par l'EE

Comme le SCE joue un rôle dans la régulation des niveaux de stress *(cf. chapitre 3)*, nous avons évalué si l'exposition à un EE pouvait moduler ce système. Afin de mesurer l'expression des gènes codant pour les protéines du SCE, nous avons utilisé l'hybridation *in situ*, une technique qui permet la localisation et la quantification d'un ARNm dans les

structures cérébrales. Les résultats obtenus montrent que l'exposition à un EE modifie l'expression de plusieurs composants du SCE. En effet, l'EE induit une augmentation de l'expression du récepteur CB1 et de la FAAH, l'enzyme de dégradation de l'anandamide dans l'hypothalamus et l'amygdale, deux régions impliquées dans la régulation de la réponse au stress (Article 1). De façon intéressante, dans une étude récente, Malone et collaborateurs ont montré, par immunohistochimie, que l'isolement social, qui représente un stress, diminue l'expression du récepteur CB1 dans l'amygdale des rats (Malone et al, 2008). D'autre part, Marsicano et collaborateurs ont exposé des souris à un stimulus anxiogène, et ont mesuré une augmentation des concentrations d'anandamide dans la BLA (Marsicano et al., 2002). Dans notre étude, nous n'avons pas évalué le taux d'ECs dans l'amygdale de souris EE, mais, étant donné l'augmentation de l'expression de la FAAH observée, on peut supposer que ce taux d'anandamide serait plus faible chez les souris EE que chez les souris SE.

Depuis quelques années, le SCE a émergé en tant que régulateur important de la réponse au stress grâce à sa capacité à moduler l'activité de l'axe HPA (Patel et al., 2004; Cota et al., 2007; Gorzalka et al., 2008; Steiner and Wotjak, 2008). Les ECs et le récepteur CB1 sont exprimés dans l'amygdale (Herkenham et al., 1991), une structure impliquée dans la régulation de la réponse au stress. Plus spécifiquement, des études d'immunohistochimie et d'électrophysiologie ont permis de démontrer que, dans la BLA, les récepteurs CB1 sont exprimés au niveau des synapses GABAergiques et glutamatergiques (Katona et al., 2001; Azad et al., 2003). Cette localisation leur confère le rôle de modulateur de l'activité des projections de la BLA vers le PVN, régulant ainsi la libération de CRF par les neurones du PVN (Herman et al., 2005). Des études *in vitro* ont aussi permis de mettre en évidence un rôle des récepteurs CB1 dans le rétrocontrôle négatif de l'activité de l'axe HPA par les glucocorticoïdes (Figure 27). Au niveau du PVN, les glucocorticoïdes induisent une augmentation rapide de la synthèse et de la libération d'ECs (Di et al., 2003). Cette libération d'ECs dans le PVN induit une suppression de la neurotransmission excitatrice présynaptique en activant les récepteurs CB1, exprimés par les neurones glutamatergiques présynaptiques, diminuant ainsi la libération de CRF par les neurones du PVN (Di et al., 2003). Dans notre étude, l'exposition à un EE augmente l'expression des récepteurs CB1 dans l'hypothalamus,

un effet qui pourrait conduire à une diminution de la libération de CRF. Par conséquent, l'activité basale de l'axe HPA serait réduite, ce qui expliquerait que les souris élevées en EE sont moins anxieuses dans le NSF test. Ceci est conforme avec les données de la littérature qui indiquaient déjà que l'EE régule l'activité basale de l'axe HPA, ainsi que la réponse hormonale aux évènements stressants. Par exemple, Belz et collaborateurs ont démontré que des animaux élevés en EE présentent un taux basal d'ACTH et de corticostérone moins important que des souris isolées (Belz et al., 2003).

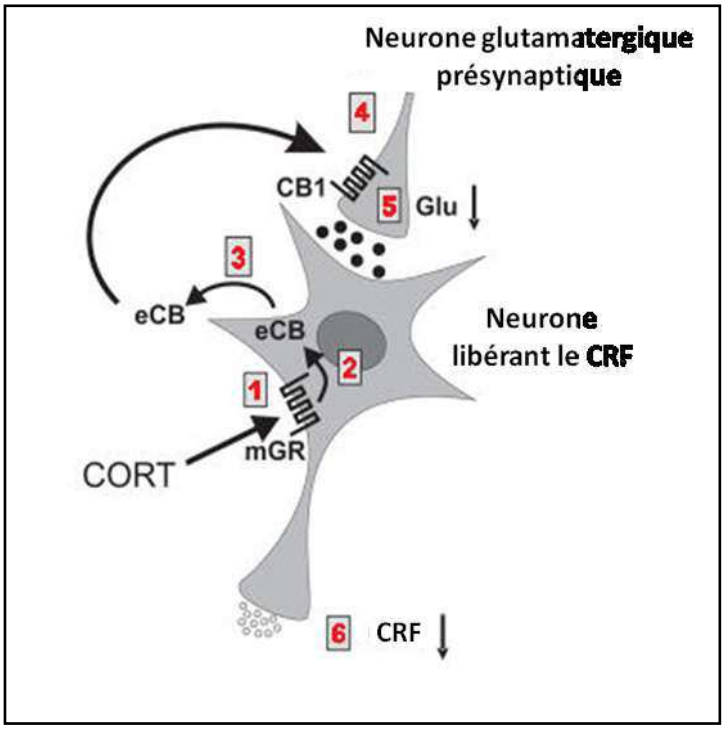


Figure 27.Schéma représentant le rétrocontrôle négatif exercé par les endocannabinoïdes (eCB) sur les neurones CRF du PVN. Suite à l'activation de l'axe HPA, la corticostérone (CORT) libérée par les glandes surrénales induit, par activation des récepteurs aux glucocorticoïdes (mGR) (1), la synthèse (2) et la libération (3) d'eCB par les neurones CRF. Ces eCB activent les récepteurs CB1 exprimés par les neurones présynaptiques glutamatergiques (4), inhibent la libération de glutamate (5), diminuant ainsi la libération de CRF par les neurones du PVN (6). *(d'après (Hill et al, 2010))*

b- Régulation du système du CRF par le « switch » environnemental

Nous avons aussi cherché à caractériser les mécanismes moléculaires sous tendant l'effet négatif du « switch » environnemental. Nous nous sommes en particulier intéressés au système du CRF, connu pour jouer un rôle important dans la régulation du stress et des émotions (Arborelius et al, 1999), et qui sous tendrait l'effet anxiolytique de l'EE (Sztainberg et al, 2010). Dans notre étude, nous avons observé, par RT-qPCR, une augmentation de l'expression du gène codant pour le neuropeptide CRF dans le BNST (Article 2). Par ailleurs, nous avons montré que l'augmentation de la vulnérabilité induite par le « switch » environnemental dépendrait de l'activation du système CRF puisque l'administration de l'antalarmin, un antagoniste du récepteur CRF1, bloque cette augmentation induite par le stress (Article 2). Ce résultat est en accord avec une étude récente qui a montré que l'exposition à un stress chronique (nage forcée répétée) augmente la CPP induite par la cocaïne de façon dépendante du récepteur CRF1 (Kreibich et al, 2009).

Le BNST constitue une structure relais entre les régions limbiques qui contrôlent l'axe HPA et le PVN (Cullinan et al., 1993). Cette augmentation de CRF pourrait donc se traduire par une augmentation de l'activité de l'axe HPA, et, par conséquent, une augmentation de la production de corticostérone, ce qui pourrait expliquer les niveaux de stress augmentés chez les souris EE>SE. Par ailleurs, le BNST est associé au circuit de la récompense puisque, sur le plan anatomique, il envoie des projections vers des structures du système de récompense comme l'ATV et le NAc, et, d'un point de vue fonctionnel, la majorité des drogues d'abus induisent une augmentation de la libération de DA dans le BNST (Carboni et al., 2000). On peut donc penser que l'augmentation du CRF dans le BNST augmente, par le biais de relais synaptiques, la libération de DA dans des structures du circuit de la récompense comme le CPF, le NAc et le BNST (pour revue (Corominas et al, 2010)), induisant, *in fine*, une augmentation des effets récompensants de la cocaïne chez les souris EE>SE.

c- Régulation de l'état de phosphorylation de CREB par le « switch » environnemental

A un niveau plus intracellulaire, la stimulation du récepteur CRF1 est couplée à l'activation de la PKA et aboutit à l'activation de facteurs de transcription, comme par

exemple le facteur CREB (Kasagi et al, 2002). Récemment, il a été montré que ce facteur CREB, en particulier dans le NAc, pourrait avoir un rôle important dans la réactivité aux drogues d'abus. Par exemple, Kreibich et collaborateurs ont montré que des souris déficientes en CREB, exposées à un stress répété (nage forcée), ne développent pas de préférence de place pour le compartiment associé à la cocaïne comme c'est le cas chez les souris sauvages (Kreibich et al, 2009). Pour notre part, nous avons observé que l'augmentation de la CPP observée chez les souris du groupe EE>SE était associée à une augmentation de la phosphorylation de CREB, dans le Shell du NAc. Ainsi nos résultats suggèrent que le « switch » environnemental constitue un évènement stressant, qui entraîne des modifications neuroendocriniennes (expression du neuropeptide CRF dans le BNST) susceptibles de conduire à des neuroadaptations, comme par exemple une augmentation de la phosphorylation de CREB dans le Shell du NAc et le BNST. Ces neuroadaptations pourraient être à l'origine des conséquences comportementales observées, notamment la mise en place d'un état émotionnel négatif et l'augmentation de la vulnérabilité à la cocaïne (Figure 28).

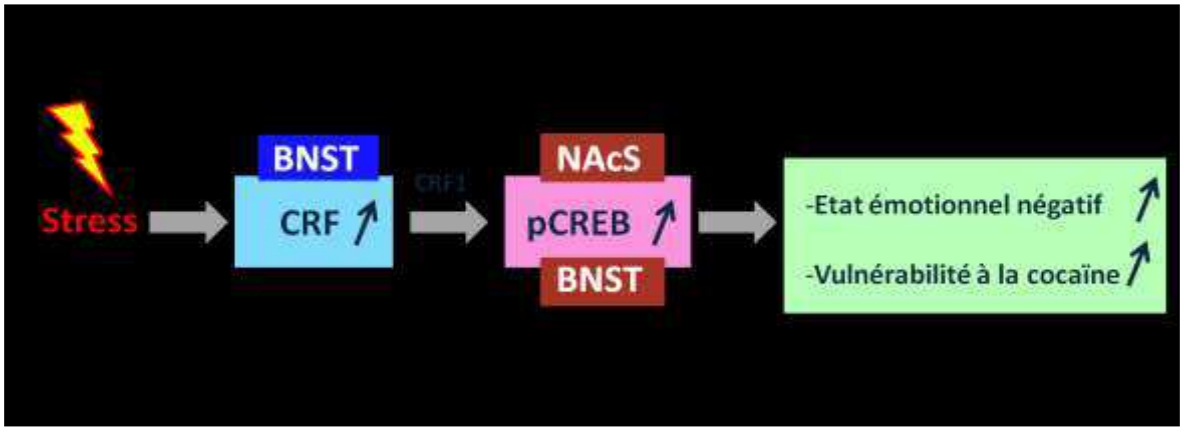


Figure 28.Schéma représentant les mécanismes potentiellement impliqués dans la mise en place des conséquences négatives induites par la perte des conditions stimulantes.

3. Perspectives

Les travaux auxquels j'ai participé pendant ma thèse ont permis de mettre en évidence des effets comportementaux et neurobiologiques qui mériteraient d'être étudiés

ultérieurement. Dans le laboratoire, nous avons commencé à aborder deux aspects concernant les effets préventifs de l'EE et les effets néfastes du « switch » environnemental.

i. Etude de l'implication de la neurotransmission dopaminergique dans les effets préventifs de l'EE sur la sensibilisation à la cocaïne

Comme nous l'avons proposé dans la revue publiée récemment, plusieurs mécanismes sont susceptibles de contribuer à la diminution de la réactivité aux drogues, induite par l'EE (Solinas et al, 2010). Nous avons testé l'hypothèse d'une action sur le niveau de stress, mais on peut envisager aussi une action plus cellulaire de l'EE, avec une régulation du fonctionnement cérébral basal, ainsi que de la réactivité des neurones aux drogues, telle que la cocaïne, à l'origine de phénomènes de plasticité synaptique durables, qui ont lieu, entre autres, au niveau du système dopaminergique, cible privilégiée des drogues toxicomanogènes (Di Chiara et Imperato, 1988). Notre équipe a montré, par exemple, que la diminution de la sensibilisation comportementale à la cocaïne et de la CPP induites par l'EE étaient associées à une modification de certains effets post-synaptiques, en particulier une diminution de la transcription des gènes à réponse précoce *zif-268* et *c-fos* (Solinas et al, 2009 ; Chauvet et al, 2011). Comme ces observations ne sont pas liées à des altérations de la quantité de DA libérée dans le NAc en réponse à la cocaïne (Solinas et al, 2009), nous envisageons une modulation plutôt postsynaptique induite par l'exposition à l'EE. Les résultats obtenus dans l'article 2, et qui indiquent une régulation du niveau de phosphorylation du facteur CREB par le switch environnemental, sont en accord avec notre hypothèse d'une régulation par l'environnement du fonctionnement cérébral, impliquant ces aires dopaminergiques. Nous avons envisagé, dans un premier temps, que l'exposition à un EE diminue l'expression des récepteurs dopaminergiques postsynaptiques, mais des manipulations réalisées dans notre laboratoire ont montré que l'exposition à un EE ne modifie pas l'expression des récepteurs D1 et D2 (résultats non publiés). Il faut donc envisager que l'exposition à un EE module directement les voies de signalisation intracellulaires activées en réponse aux drogues d'abus.

Parmi ces voies de signalisation, nous envisageons d'étudier plus particulièrement la voie des MAP kinases (Figure 29). En effet, de nombreuses études ont permis de montrer que l'exposition à la cocaïne augmentait l'activité de la kinase ERK dans l'ATV, le NAc, l'amygdale, le BNST et le CPF, des régions impliquées dans la sensibilisation comportementale induite par la cocaïne (pour revue (Vanderschuren et Kalivas, 2000)). Par exemple, l'administration aigue de cocaïne entraîne, chez la souris, une augmentation rapide et transitoire de la phosphorylation de ERK dans les neurones du NAc (Valjent et al., 2000a), alors que l'injection systémique du SL327, un inhibiteur de MEK, bloque cet effet (Valjent et al., 2000a). L'activation de la kinase ERK dépend à la fois des récepteurs dopaminergiques D1 et des récepteurs glutamatergiques de type NMDA (Valjent et al, 2005). De plus, Valjent et collaborateurs ont montré que la phosphorylation de ERK induite par la cocaïne nécessite l'intervention de DARPP-32 puisque des souris KO pour cette phosphatase présentent une diminution de la phosphorylation de ERK en réponse à la cocaïne (Valjent et al, 2005). Cette voie de signalisation semble nécessaire à la mise en place des effets comportementaux durables des drogues car le blocage pharmacologique de la kinase ERK affecte peu les effets immédiats des psychostimulants, mais empêche le développement de certaines réponses plus durables comme la sensibilisation comportementale (Valjent et al, 2005 ; Valjent et al, 2006) et la CPP (Valjent et al., 2000a). Une fois phosphorylée, la kinase ERK induit l'activation de facteurs de transcription comme le facteur CREB (Mattson et al, 2005) qui, à son tour, active la transcription de gènes à réponse précoce comme *zif-268* et *c-fos* (Mattson et al, 2005 ; Radawanska et al, 2005) (Figure 29).

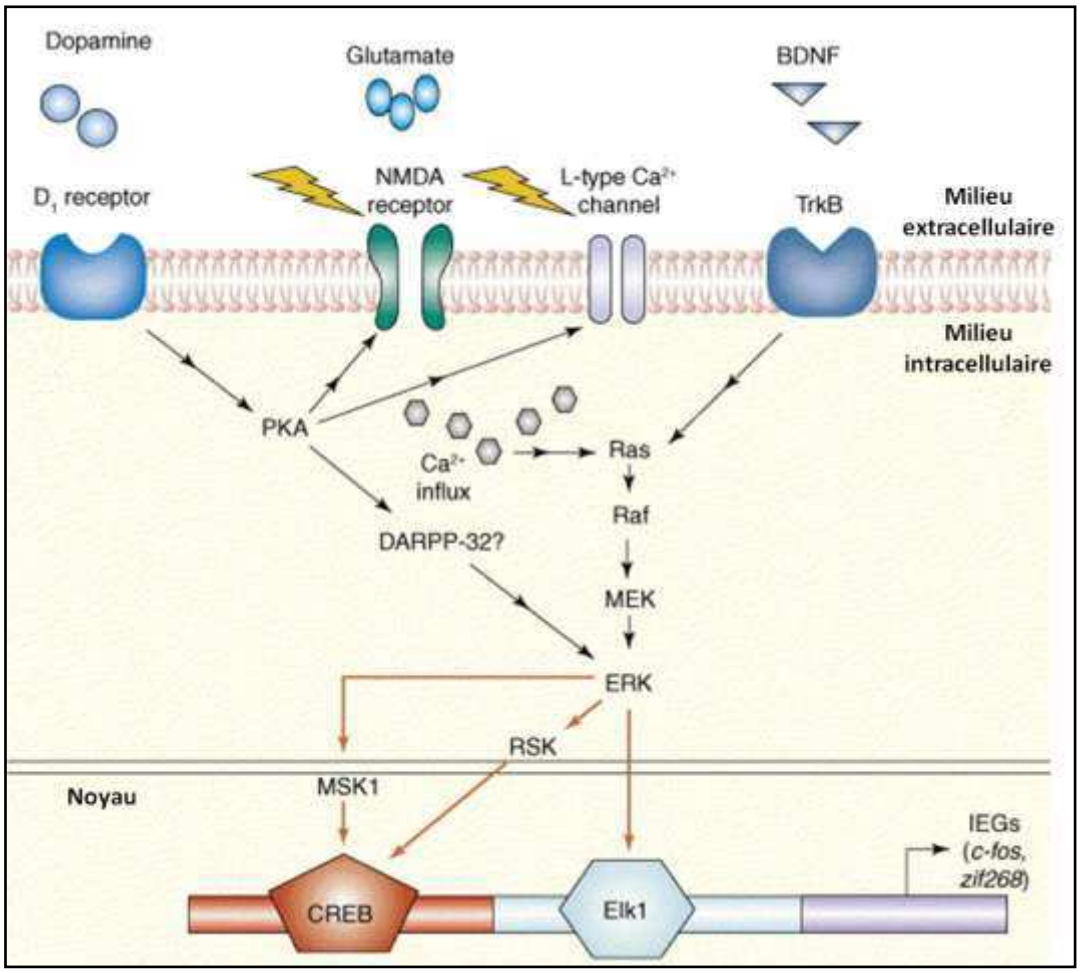


Figure 29. Schéma représentatif des voies de signalisation intracellulaires activées en réponse aux drogues d'abus. *(d'après (Lu et al, 2006))*

Ainsi, l'activation de la kinase ERK semble constituer une étape cruciale dans la mise en place des effets comportementaux durables des drogues d'abus (pour revue (Lu et al, 2006)). Cela nous a permis de proposer que l'activation par la cocaïne de cette kinase pourrait représenter un mécanisme régulé par l'EE et partant, les adaptations à long terme responsables de la mise en place de la dépendance le seraient aussi. Afin de tester cette hypothèse, des études sont prévues au laboratoire pour étudier l'effet de l'environnement d'élevage sur les évènements qui ont lieu en amont et en aval de la phosphorylation de la kinase ERK. Pour cela, nous utiliserons un protocole de sensibilisation comportementale à la cocaïne (Solinas et al, 2009), et nous essaierons de caractériser, par western blot, la

modulation par l'EE des événements postsynaptiques déclenchés par la cocaïne comme par exemple, la régulation de la phosphorylation de l'inhibiteur de phosphatase DARPP32, des kinases MEK et ERK, ainsi que celle des cibles de ERK comme le facteur de transcription CREB, dans des régions impliquées dans l'addiction comme le NAc, le CPu et le CPF. Grâce à cette approche plus cellulaire, nous devrions pouvoir caractériser l'impact des conditions expérimentales sur la réactivité de la neurotransmission dopaminergique à la cocaïne.

ii. Existe-t-il une ségrégation neuronale de la phosphorylation de CREB induite par le « switch » EE>SE ?

Comme l'activation de CREB dans le NAc a été associée aux effets récompensants des drogues d'abus (Carlezon et al, 1998 ; Nestler, 2004), l'activation de CREB lors du « switch » représenterait un mécanisme moléculaire conduisant à la modulation des circuits neuronaux impliqués dans l'addiction aux drogues, et, par conséquent, à l'augmentation de la vulnérabilité à la cocaïne. Toutefois, il faut rester prudent car une étude précédente a montré que l'augmentation de la phosphorylation de CREB dans le NAc diminue les effets récompensants des drogues d'abus (Carlezon et al, 1998). En effet, Carlezon et collaborateurs ont montré que des souris surexprimant CREB dans le Shell du NAc, par injection locale de vecteurs viraux, ne développent pas de préférence de place pour le compartiment associé à la cocaïne (Carlezon et al, 1998). Ainsi, une augmentation de la phosphorylation de CREB dans une même région induit deux effets opposés dans un modèle de CPP. Ceci pourrait être expliqué par une spécificité cellulaire de la réponse au « switch » environnemental. En effet, le striatum est principalement constitué de neurones épineux moyens, formant, sur le plan fonctionnel, deux voies distinctes : (1) la voie directe, nigrostriatale, formée par les neurones exprimant le récepteur dopaminergique D1, et (2) la voie indirecte, pallidostriatale, formée par les neurones exprimant le récepteur dopaminergique D2 (Gerfen et al, 1990). De plus, la phosphorylation de CREB dépend aussi bien de l'activation du récepteur D1 (Dudman et al, 2003) que de celle du récepteur D2 (Yan et al, 1999). Nous avons donc décidé d'étudier si le « switch » environnemental induit une

activation sélective de CREB, dans l'une ou l'autre des deux sous-populations neuronales du striatum. En effet, un effet sélectif dans l'une de ces deux populations neuronales pourrait expliquer les différences observées entre, d'une part, les effets des manipulations environnementales obtenus par Kreibich (Kreibich et al, 2009) et nous (article 2), et, d'autre part, les effets des injections de vecteurs viraux qui augmentent le CREB dans toutes les populations cellulaires striatales. Afin de tester cette hypothèse, et de caractériser la spécificité cellulaire de la réponse au « switch » environnemental, nous utiliserons des souris transgéniques BAC, fournies par le laboratoire de JA Girault (INSERM, Institut du Fer à Moulin, Paris). Ces souris ont la caractéristique d'exprimer la protéine fluorescente GFP sous le contrôle du gène codant pour le récepteur dopaminergique D1, permettant ainsi d'identifier par co-localisation les cellules exprimant pCREB en réponse au switch. Dans ce but, des souris seront élevées en SE ou en EE pendant deux mois, puis nous réaliserons le « switch » environnemental pendant 7 jours. Par la suite, nous quantifierons, par immunohistochimie, les neurones co-exprimant pCREB et la GFP. Cette approche devrait nous permettre de caractériser s'il existe une ségrégation neuronale de cette phosphorylation de CREB engendrée par le switch.

B- Stratégies pour prévenir la neurotoxicité de la METH

Ces dernières années, la consommation de la METH a considérablement augmenté, notamment auprès des jeunes adultes, ce qui représente un risque de santé publique. En effet, cette drogue induit une forte toxicité neuronale puisque son administration aigue ou répétée induit une dégénérescence des terminaisons dopaminergiques et sérotoninergiques, ainsi qu'une mort neuronale par apoptose (pour revue (Krasnova et Cadet, 2009)). Par ailleurs, chez l'Homme, sa consommation est associée à des déficits cognitifs et moteurs (Scott et al, 2007). Ainsi, la recherche de facteurs neuroprotecteurs contre la toxicité induite par la METH devient indispensable.

1. Rappel : L'exposition à l'EE ne réduit pas la toxicité de la METH

Une étude récente du laboratoire a permis d'observer que l'exposition à un EE ne réduit ni les propriétés récompensantes ni la neurotoxicité de la METH (Thiriet et al., 2011), alors qu'il exerce des effets bénéfiques contre la consommation d'autres drogues (cocaïne) et contre les dommages observés dans diverses pathologies (pour revue (Laviola et al, 2008)). Par exemple, l'exposition à un EE avant l'administration du MPTP rend les souris plus résistantes à la toxicité induite par cette toxine (Bezard et al, 2003). De plus, des rats exposés à un EE après l'injection de la 6-OHDA présentent une amélioration de leurs fonctions motrices (Jadavji et al, 2006). Bien que la cocaïne et la METH aient la même cible moléculaire, l'absence de protection par l'EE peut être due au fait qu'elles agissent différemment au niveau de la fente synaptique. En effet, alors que la cocaïne inhibe les DATs, la METH, elle, induit une importante augmentation de la libération de DA (Fleckenstein et al, 2000). Cet excès dopaminergique induit, à long terme, une dégénérescence des terminaisons dopaminergiques en déclenchant plusieurs évènements cellulaires et moléculaires toxiques comme le stress oxydatif et l'excitotoxicité *(cf. chapitre 1).* Cette absence de protection met en lumière la dangerosité de la METH pour l'ensemble des consommateurs et incite à rechercher de nouvelles approches pour protéger contre ses effets neurotoxiques.

2. La stimulation pharmacologique du SCE : une nouvelle approche pour prévenir la toxicité induite par la METH

Dans l'article 3, nous avons montré qu'une augmentation de l'activité du SCE, par stimulation pharmacologique avant l'exposition à la drogue, permet de contrer les processus neurotoxiques déclenchés par la METH. De plus, cette protection serait dépendante des récepteurs CB2. Nos résultats représentent un argument supplémentaire soulignant le rôle du récepteur CB2 dans la fonction neuroprotectrice du SCE. En effet, de plus en plus de données sont en faveur de l'implication de ce récepteur dans des processus physiologiques déclenchés pour protéger contre des processus associés à la neurodégénérescence et à la neuroinflammation. Il apparaît que, dans le cadre de la maladie d'Alzheimer par exemple,

l'expression des récepteurs CB2 est augmentée dans les cellules microgliales actives, et leur activation sélective réduit l'accumulation de marqueurs neurotoxiques caractéristiques de l'état inflammatoire qui accompagne la maladie (Ramirez et al., 2005; Fernandez-Ruiz et al., 2007). De plus, dans une étude récente réalisée chez la souris, il a été montré que la surexpression du récepteur CB2 diminuait la vulnérabilité des neurones dopaminergiques nigrostriataux face à la neurotoxicité induite par l'injection de 6-OHDA dans le striatum (Ternianov et al, 2012). Par ailleurs, l'administration d'un agoniste sélectif du récepteur CB2 (HU-208) diminue la neuroinflammation, la perte neuronale striatale et les déficits moteurs induits par l'administration d'acide quinolinique, dans un modèle animal de la maladie de Huntington (Palazuelos et al, 2009). Au vu de nos résultats et de ceux de la littérature, le récepteur CB2 jouerait un rôle crucial dans l'atténuation de l'activation microgliale et la dégénérescence neuronale, ouvrant ainsi le chemin pour de nouvelles stratégies thérapeutiques pour protéger contre les processus neurotoxiques induits par les amphétamines, mais qui peuvent aussi participer à la physiopathologie de certaines maladies neurodégénératives.

Rappelons que, dans l'article 1, nous avons montré que l'exposition à un EE régule l'expression de gènes codant pour des protéines du SCE. Au vu de ce résultat, on pouvait envisager que l'exposition à l'EE soit également capable de prévenir les dommages engendrés par la METH. Toutefois, ces modifications transcriptionnelles ont lieu dans l'hypothalamus et l'amygdale, deux régions très impliquées dans la régulation du stress (article 1). Par contre, aucune modification n'a été observée dans le striatum, qui représente la structure la plus atteinte par la perte des terminaisons dopaminergiques induites par la METH (Fleckenstein et al, 2000). Tous ces éléments pourraient expliquer le fait que malgré la stimulation du SCE qu'il induit, l'EE ne protège pas contre les effets addictifs et neurotoxiques de la METH.

3. Perspectives : caractériser les mécanismes sous tendant la neuroprotection induite par le SCE

i. Quel récepteur est impliqué dans la protection induite par le JZL184 ?

Dans l'article 3, nous avons montré que l'inhibition de la FAAH ou de la MGL, à l'aide de l'URB597 ou du JZL184 respectivement, protégeait contre la neurotoxicité induite par la METH. Cependant, au moment où l'article a été rédigé, nous n'avions identifié que le récepteur impliqué dans la protection induite par l'URB597, à savoir le récepteur CB2. Des manipulations sont en cours afin de déterminer si la protection induite par le JZL184 est, elle aussi, médiée par le récepteur CB2, ou si elle implique le récepteur CB1 ou d'autres récepteurs non cannabinoïdes comme par exemple le récepteur vanilloïde.

ii. Régulation de l'activité microgliale

Dans l'article 3, nous avons proposé plusieurs mécanismes qui sous tendraient la protection induite par le SCE contre la toxicité de la METH. La modulation de l'activité microgliale constitue une piste privilégiée pour plusieurs raisons. En effet, la METH induit une activation microgliale dans des régions dopaminergiques comme le striatum (Sekine et al., 2008), aussi bien chez l'Homme (Sekine et al, 2008) que dans des modèles animaux (Bowyer et al, 1994 ; LaVoie et al, 2004). De plus, l'application de la DA quinone, qui est aussi générée en réponse à la METH *(cf. chapitre 1)*, à des microglies en culture modifie l'expression de plusieurs gènes microgliaux en augmentant, par exemple, l'expression de ceux qui contribuent aux processus inflammatoires et aux dommages membranaires et cellulaires, comme le gène codant pour le TNF-alpha, et en diminuant l'expression de récepteurs microgliaux qui interviennent dans l'action anti-oxydante des microglies (Kuhn et al., 2006). Le cumul de ces modifications limiterait les capacités anti-inflammatoires des cellules microgliales, et participerait à l'amplification de l'atteinte neuronale induite par la METH. Par ailleurs, il a déjà été montré que le récepteur CB2 joue un rôle dans la régulation des réactions inflammatoires dans le cadre de plusieurs maladies neurodégénératives

(Ramirez et al, 2005 ; Fernandez-Ruiz et al, 2007). Il est donc possible que l'activation des récepteurs CB2, induise une réduction de la production de facteurs neurotoxiques produits par les microglies réactives comme le TNF-alpha, les ROS et le NO (Klegeris et al, 2003 ; Fernandez-Ruiz et al, 2007), protégeant ainsi les neurones dopaminergiques contre la toxicité induite par la METH. Afin de tester cette hypothèse, nous envisageons de traiter des souris avec de la METH (30mg/kg, i.p.), et de stimuler le SCE directement, en utilisant un agoniste sélectif des récepteurs CB2 comme l'AM1241 (Ibrahim et al, 2003), ou indirectement, en inhibant la dégradation des ECs à l'aide de l'URB597 et/ou le JZL184. Nous doserons ensuite, par ELISA, la quantité de TNF-alpha libérée dans le striatum de ces souris. Si des différences sont observées, elles supposeraient une action régulatrice du SCE sur cette réaction mirogliale déclenchée par la METH.

Conclusion

L'effet protecteur de l'exposition à des conditions de vie stimulantes contre l'addiction aux drogues a été largement étudié, mais les mécanismes sous tendant cette protection restent à déterminer. Ce travail de thèse nous a permis d'apporter, dans un premier temps, un argument en faveur d'une action de l'EE sur les niveaux de stress de l'individu. Toutefois, cette protection nécessite le maintien des conditions positives puisque le passage d'un environnement favorable vers un autre qui l'est moins, rend les individus plus vulnérables aux effets récompensants des drogues. Ce phénomène inattendu expliquerait le fait que, si elles rencontrent des accidents de la vie, comme la perte d'un statut socio-économique ou la perte du soutien de personnes très proches, des personnes ayant eu un bon niveau socio-économique et des conditions de vie plutôt positives pendant l'adolescence peuvent également développer des dépendances aux drogues d'abus. Les mécanismes sous tendant ces effets méritent d'être étudiés afin de mieux comprendre comment les expériences de vie modifient le cerveau et déterminent les risques de développement de maladies psychiatriques.

Par ailleurs, au vu de la consommation croissante de la METH ces dernières années (Figure 2) et de son importante toxicité *(cf. chapitre 1)*, la recherche d'approches pour réduire les dommages qu'elle induit a constitué notre deuxième axe de recherche. Nous avons alors montré que la stimulation du SCE, et plus particulièrement l'activation des récepteurs CB2, constitue une cible potentielle pour protéger contre des mécanismes toxiques sous tendant la toxicité de ce psychostimulant. Etant donné que la METH déclenche des mécanismes identiques à ceux observés dans des maladies neurodégénératives *(cf. chapitre 1)*, ce travail de thèse permet de suggérer qu'une stimulation directe ou indirecte du SCE pourrait être utilisée comme stratégie thérapeutique pour réduire le développement et éventuellement traiter des maladies neurodégénératives.

Références Bibliographiques

A

Albers DS, Sonsalla PK (1995) Methamphetamine-induced hyperthermia and dopaminergic neurotoxicity in mice: pharmacological profile of protective and nonprotective agents. J Pharmacol Exp Ther 275:1104-1114.

Albertson TE, Derlet RW, Van Hoozen BE (1999) Methamphetamine and the expanding complications of amphetamines. West J Med 170:214-219.

Alheid GF (2003) Extended amygdala and basal forebrain. Ann N Y Acad Sci 985:185-205.

Ali SF, Newport GD, Slikker W, Jr. (1996) Methamphetamine-induced dopaminergic toxicity in mice. Role of environmental temperature and pharmacological agents. Ann N Y Acad Sci 801:187-198.

Ambre J, Ruo TI, Nelson J, Belknap S (1988) Urinary excretion of cocaine, benzoylecgonine, and ecgonine methyl ester in humans. J Anal Toxicol 12:301-306.

Arborelius L, Owens MJ, Plotsky PM, Nemeroff CB (1999) The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. J Endocrinol 160:1-12.

Ashton JC, Glass M (2007) The cannabinoid CB2 receptor as a target for inflammation-dependent neurodegeneration. Curr Neuropharmacol 5:73-80.

Azad SC, Eder M, Marsicano G, Lutz B, Zieglgansberger W, Rammes G (2003) Activation of the cannabinoid receptor type 1 decreases glutamatergic and GABAergic synaptic transmission in the lateral amygdala of the mouse. Learn Mem 10:116-128.

B

Banasr M, Valentine GW, Li XY, Gourley SL, Taylor JR, Duman RS (2007) Chronic unpredictable stress decreases cell proliferation in the cerebral cortex of the adult rat. Biol Psychiatry 62:496-504.

Bardo MT, Robinet PM, Hammer RF, Jr. (1997) Effect of differential rearing environments on morphine-induced behaviors, opioid receptors and dopamine synthesis. Neuropharmacology 36:251-259.

Bardo MT, Klebaur JE, Valone JM, Deaton C (2001) Environmental enrichment decreases intravenous self-administration of amphetamine in female and male rats. Psychopharmacology (Berl) 155:278-284.

Bardo MT, Bowling SL, Rowlett JK, Manderscheid P, Buxton ST, Dwoskin LP (1995) Environmental enrichment attenuates locomotor sensitization, but not in vitro dopamine release, induced by amphetamine. Pharmacol Biochem Behav 51:397-405.

Barr AM, Panenka WJ, MacEwan GW, Thornton AE, Lang DJ, Honer WG, Lecomte T (2006) The need for speed: an update on methamphetamine addiction. J Psychiatry Neurosci 31:301-313.

Barrot M, Olivier JD, Perrotti LI, DiLeone RJ, Berton O, Eisch AJ, Impey S, Storm DR, Neve RL, Yin JC, Zachariou V, Nestler EJ (2002) CREB activity in the nucleus accumbens shell controls gating of behavioral responses to emotional stimuli. Proc Natl Acad Sci U S A 99:11435-11440.

Battaglia G, Fornai F, Busceti CL, Aloisi G, Cerrito F, De Blasi A, Melchiorri D, Nicoletti F (2002) Selective blockade of mGlu5 metabotropic glutamate receptors is protective against methamphetamine neurotoxicity. J Neurosci 22:2135-2141.

Baumann MH, Raley TJ, Partilla JS, Rothman RB (1993) Biosynthesis of dopamine and serotonin in the rat brain after repeated cocaine injections: a microdissection mapping study. Synapse 14:40-50.

Baumann MH, Gendron TM, Becketts KM, Henningfield JE, Gorelick DA, Rothman RB (1995) Effects of intravenous cocaine on plasma cortisol and prolactin in human cocaine abusers. Biol Psychiatry 38:751-755.

Bayewitch M, Rhee MH, Avidor-Reiss T, Breuer A, Mechoulam R, Vogel Z (1996) (-)-Delta9-tetrahydrocannabinol antagonizes the peripheral cannabinoid receptor-mediated inhibition of adenylyl cyclase. J Biol Chem 271:9902-9905.

Beal MF (1992) Mechanisms of excitotoxicity in neurologic diseases. Faseb J 6:3338-3344.

Belz EE, Kennell JS, Czambel RK, Rubin RT, Rhodes ME (2003) Environmental enrichment lowers stress-responsive hormones in singly housed male and female rats. Pharmacol Biochem Behav 76:481-486.

Bergman J, Kamien JB, Spealman RD (1990) Antagonism of cocaine self-administration by selective dopamine D(1) and D(2) antagonists. Behav Pharmacol 1:355-363.

Bezard E, Dovero S, Belin D, Duconger S, Jackson-Lewis V, Przedborski S, Piazza PV, Gross CE, Jaber M (2003) Enriched environment confers resistance to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and cocaine: involvement of dopamine transporter and trophic factors. J Neurosci 23:10999-11007.

Bisagno V, Ferrini M, Rios H, Zieher LM, Wikinski SI (2000) Chronic corticosterone impairs inhibitory avoidance in rats: possible link with atrophy of hippocampal CA3 neurons. Pharmacol Biochem Behav 66:235-240.

Bisogno T, Sepe N, Melck D, Maurelli S, De Petrocellis L, Di Marzo V (1997) Biosynthesis, release and degradation of the novel endogenous cannabimimetic metabolite 2-arachidonoylglycerol in mouse neuroblastoma cells. Biochem J 322 (Pt 2):671-677.

Blednov YA, Cravatt BF, Boehm SL, 2nd, Walker D, Harris RA (2007) Role of endocannabinoids in alcohol consumption and intoxication: studies of mice lacking fatty acid amide hydrolase. Neuropsychopharmacology 32:1570-1582.

Block ML, Zecca L, Hong JS (2007) Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. Nat Rev Neurosci 8:57-69.

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

Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Bourrie B, Canat X, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G, Casellas P (1995) Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. Biochem J 312 (Pt 2):637-641.

Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Marchand J, Canat X, Bourrie B, Rinaldi-Carmona M, Calandra B, Le Fur G, Casellas P (1996) Signaling pathway associated with stimulation of CB2 peripheral cannabinoid receptor. Involvement of both mitogen-activated protein kinase and induction of Krox-24 expression. Eur J Biochem 237:704-711.

Bowling SL, Bardo MT (1994) Locomotor and rewarding effects of amphetamine in enriched, social, and isolate reared rats. Pharmacol Biochem Behav 48:459-464.

Bowyer JF, Gough B, Slikker W, Jr., Lipe GW, Newport GD, Holson RR (1993) Effects of a cold environment or age on methamphetamine-induced dopamine release in the caudate putamen of female rats. Pharmacol Biochem Behav 44:87-98.

Bowyer JF, Davies DL, Schmued L, Broening HW, Newport GD, Slikker W, Jr., Holson RR (1994) Further studies of the role of hyperthermia in methamphetamine neurotoxicity. J Pharmacol Exp Ther 268:1571-1580.

Bremner JD, Southwick SM, Darnell A, Charney DS (1996) Chronic PTSD in Vietnam combat veterans: course of illness and substance abuse. Am J Psychiatry 153:369-375.

Brenes JC, Rodriguez O, Fornaguera J (2008) Differential effect of environment enrichment and social isolation on depressive-like behavior, spontaneous activity and serotonin and norepinephrine concentration in prefrontal cortex and ventral striatum. Pharmacol Biochem Behav 89:85-93.

Brenes JC, Padilla M, Fornaguera J (2009) A detailed analysis of open-field habituation and behavioral and neurochemical antidepressant-like effects in postweaning enriched rats. Behav Brain Res 197:125-137.

Brown JM, Hanson GR, Fleckenstein AE (2000) Methamphetamine rapidly decreases vesicular dopamine uptake. J Neurochem 74:2221-2223.

Brown JM, Quinton MS, Yamamoto BK (2005) Methamphetamine-induced inhibition of mitochondrial complex II: roles of glutamate and peroxynitrite. J Neurochem 95:429-436.

Brusco A, Tagliaferro P, Saez T, Onaivi ES (2008) Postsynaptic localization of CB2 cannabinoid receptors in the rat hippocampus. Synapse 62:944-949.

Buchanan JB, Sparkman NL, Johnson RW (2010) A neurotoxic regimen of methamphetamine exacerbates the febrile and neuroinflammatory response to a subsequent peripheral immune stimulus. J Neuroinflammation 7:82.

Burrows KB, Gudelsky G, Yamamoto BK (2000) Rapid and transient inhibition of mitochondrial function following methamphetamine or 3,4-methylenedioxymethamphetamine administration. Eur J Pharmacol 398:11-18.

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

C

Cabral GA, Raborn ES, Griffin L, Dennis J, Marciano-Cabral F (2008) CB2 receptors in the brain: role in central immune function. Br J Pharmacol 153:240-251.

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

Cadet JL, Brannock C (1998) Free radicals and the pathobiology of brain dopamine systems. Neurochem Int 32:117-131.

Cadet JL, Ordonez SV, Ordonez JV (1997) Methamphetamine induces apoptosis in immortalized neural cells: protection by the proto-oncogene, bcl-2. Synapse 25:176-184.

Cadet JL, McCoy MT, Ladenheim B (2002) Distinct gene expression signatures in the striata of wild-type and heterozygous c-fos knockout mice following methamphetamine administration: evidence from cDNA array analyses. Synapse 44:211-226.

Cadet JL, Jayanthi S, Deng X (2003) Speed kills: cellular and molecular bases of methamphetamine-induced nerve terminal degeneration and neuronal apoptosis. FASEB J 17:1775-1788.

Cadet JL, Krasnova IN, Jayanthi S, Lyles J (2007) Neurotoxicity of substituted amphetamines: molecular and cellular mechanisms. Neurotox Res 11:183-202.

Cadet JL, Sheng P, Ali S, Rothman R, Carlson E, Epstein C (1994) Attenuation of methamphetamine-induced neurotoxicity in copper/zinc superoxide dismutase transgenic mice. J Neurochem 62:380-383.

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

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

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

Caine SB, Heinrichs SC, Coffin VL, Koob GF (1995) Effects of the dopamine D-1 antagonist SCH 23390 microinjected into the accumbens, amygdala or striatum on cocaine self-administration in the rat. Brain Res 692:47-56.

Caldwell J, Dring LG, Williams RT (1972) Metabolism of (14 C)methamphetamine in man, the guinea pig and the rat. Biochem J 129:11-22.

Calof AL (1995) Intrinsic and extrinsic factors regulating vertebrate neurogenesis. Curr Opin Neurobiol 5:19-27.

Cameron HA, Gould E (1994) Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. Neuroscience 61:203-209.

Campbell VA (2001) Tetrahydrocannabinol-induced apoptosis of cultured cortical neurones is associated with cytochrome c release and caspase-3 activation. Neuropharmacology 40:702-709.

Campos AC, Ferreira FR, GuimarÃ£es FS, Lemos JI (2010) Facilitation of endocannabinoid effects in the ventral hippocampus modulates anxiety-like behaviors depending on previous stress experience. Neuroscience 167:238-246.

Carboni E, Silvagni A, Rolando MT, Di Chiara G (2000) Stimulation of in vivo dopamine transmission in the bed nucleus of stria terminalis by reinforcing drugs. J Neurosci 20:RC102.

Carlezon WA, Jr., Duman RS, Nestler EJ (2005) The many faces of CREB. Trends Neurosci 28:436-445.

Carlezon WA, Jr., Thome J, Olson VG, Lane-Ladd SB, Brodkin ES, Hiroi N, Duman RS, Neve RL, Nestler EJ (1998) Regulation of cocaine reward by CREB. Science 282:2272-2275.

Carlisle SJ, Marciano-Cabral F, Staab A, Ludwick C, Cabral GA (2002) Differential expression of the CB2 cannabinoid receptor by rodent macrophages and macrophage-like cells in relation to cell activation. Int Immunopharmacol 2:69-82.

Casanova ML, Blazquez C, Martinez-Palacio J, Villanueva C, Fernandez-Acenero MJ, Huffman JW, Jorcano JL, Guzman M (2003) Inhibition of skin tumor growth and angiogenesis in vivo by activation of cannabinoid receptors. J Clin Invest 111:43-50.

Cavuoto P, McAinch AJ, Hatzinikolas G, Janovska A, Game P, Wittert GA (2007) The expression of receptors for endocannabinoids in human and rodent skeletal muscle. Biochem Biophys Res Commun 364:105-110.

Chan GC, Hinds TR, Impey S, Storm DR (1998) Hippocampal neurotoxicity of Delta9-tetrahydrocannabinol. J Neurosci 18:5322-5332.

Chan P, Di Monte DA, Luo JJ, DeLanney LE, Irwin I, Langston JW (1994) Rapid ATP loss caused by methamphetamine in the mouse striatum: relationship between energy impairment and dopaminergic neurotoxicity. J Neurochem 62:2484-2487.

Chang L, Cloak C, Patterson K, Grob C, Miller EN, Ernst T (2005) Enlarged striatum in abstinent methamphetamine abusers: a possible compensatory response. Biol Psychiatry 57:967-974.

Chang L, Ernst T, Speck O, Patel H, DeSilva M, Leonido-Yee M, Miller EN (2002) Perfusion MRI and computerized cognitive test abnormalities in abstinent methamphetamine users. Psychiatry Res 114:65-79.

Chaperon F, Soubrie P, Puech AJ, Thiebot MH (1998) Involvement of central cannabinoid (CB1) receptors in the establishment of place conditioning in rats. Psychopharmacology (Berl) 135:324-332.

Chauvet C, Lardeux V, Goldberg SR, Jaber M, Solinas M (2009) Environmental enrichment reduces cocaine seeking and reinstatement induced by cues and stress but not by cocaine. Neuropsychopharmacology 34:2767-2778.

Cheer JF, Wassum KM, Sombers LA, Heien ML, Ariansen JL, Aragona BJ, Phillips PE, Wightman RM (2007) Phasic dopamine release evoked by abused substances requires cannabinoid receptor activation. J Neurosci 27:791-795.

Chen JP, Paredes W, Lowinson JH, Gardner EL (1991) Strain-specific facilitation of dopamine efflux by delta 9-tetrahydrocannabinol in the nucleus accumbens of rat: an in vivo microdialysis study. Neurosci Lett 129:136-180.

Chiadmi F, Schlatter J (2009) [Crystal meth: a particular form of methamphetamine]. Presse Med 38:63-67.

Childers SR (2006) Activation of G-proteins in brain by endogenous and exogenous cannabinoids. Aaps J 8:E112-117.

Chipana C, Torres I, Camarasa J, Pubill D, Escubedo E (2008) Memantine protects against amphetamine derivatives-induced neurotoxic damage in rodents. Neuropharmacology 54:1254-1263.

Cohen C, Perrault G, Voltz C, Steinberg R, Soubrie P (2002) SR141716, a central cannabinoid (CB(1)) receptor antagonist, blocks the motivational and dopamine-releasing effects of nicotine in rats. Behav Pharmacol 13:451-463.

Colby CR, Whisler K, Steffen C, Nestler EJ, Self DW (2003) Striatal cell type-specific overexpression of DeltaFosB enhances incentive for cocaine. J Neurosci 23:2488-2493.

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

Cota D, Steiner MA, Marsicano G, Cervino C, Herman JP, Grubler Y, Stalla J, Pasquali R, Lutz B, Stalla GK, Pagotto U (2007) Requirement of cannabinoid receptor type 1 for the basal modulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. Endocrinology 148:1574-1581.

Cota D, Marsicano G, Tschop M, Grubler Y, Flachskamm C, Schubert M, Auer D, Yassouridis A, Thone-Reineke C, Ortmann S, Tomassoni F, Cervino C, Nisoli E, Linthorst AC, Pasquali R, Lutz B, Stalla GK, Pagotto U (2003) The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. J Clin Invest 112:423-431.

Cracchiolo JR, Mori T, Nazian SJ, Tan J, Potter H, Arendash GW (2007) Enhanced cognitive activity--over and above social or physical activity--is required to protect Alzheimer's mice against cognitive impairment, reduce Abeta deposition, and increase synaptic immunoreactivity. Neurobiol Learn Mem 88:277-294.

Cravatt BF, Demarest K, Patricelli MP, Bracey MH, Giang DK, Martin BR, Lichtman AH (2001) Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. Proc Natl Acad Sci U S A 98:9371-9376.

Cullinan WE, Herman JP, Watson SJ (1993) Ventral subicular interaction with the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence for a relay in the bed nucleus of the stria terminalis. J Comp Neurol 332:1-20.

D

Davidson C, Gow AJ, Lee TH, Ellinwood EH (2001) Methamphetamine neurotoxicity: necrotic and apoptotic mechanisms and relevance to human abuse and treatment. Brain Res Brain Res Rev 36:1-22.

Dawson VL, Dawson TM, London ED, Bredt DS, Snyder SH (1991) Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. Proc Natl Acad Sci U S A 88:6368-6371.

De Bellis MD, Baum AS, Birmaher B, Keshavan MS, Eccard CH, Boring AM, Jenkins FJ, Ryan ND (1999) A.E. Bennett Research Award. Developmental traumatology. Part I: Biological stress systems. Biol Psychiatry 45:1259-1270.

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

Dembo R, Dertke M, Borders S, Washburn M, Schmeidler J (1988) The relationship between physical and sexual abuse and tobacco, alcohol, and illicit drug use among youths in a juvenile detention center. Int J Addict 23:351-378.

Deminiere JM, Piazza PV, Guegan G, Abrous N, Maccari S, Le Moal M, Simon H (1992) Increased locomotor response to novelty and propensity to intravenous amphetamine self-administration in adult offspring of stressed mothers. Brain Res 586:135-139.

Deng X, Jayanthi S, Ladenheim B, Krasnova IN, Cadet JL (2002) Mice with partial deficiency of c-Jun show attenuation of methamphetamine-induced neuronal apoptosis. Mol Pharmacol 62:993-1000.

Derkinderen P, Ledent C, Parmentier M, Girault JA (2001) Cannabinoids activate p38 mitogen-activated protein kinases through CB1 receptors in hippocampus. J Neurochem 77:957-960.

Derkinderen P, Valjent E, Toutant M, Corvol JC, Enslen H, Ledent C, Trzaskos J, Caboche J, Girault JA (2003) Regulation of extracellular signal-regulated kinase by cannabinoids in hippocampus. J Neurosci 23:2371-2382.

Desarnaud F, Cadas H, Piomelli D (1995) Anandamide amidohydrolase activity in rat brain microsomes. Identification and partial characterization. J Biol Chem 270:6030-6035.

Devane WA, Dysarz FA, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC (1988) Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. Mol Pharmacol 34:605-613.

Devane WA, Breuer A, Sheskin T, JÃ¤rbe TU, Eisen MS, Mechoulam R (1992) A novel probe for the cannabinoid receptor. J Med Chem 35:2065-2069.

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

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

Di Chiara G, Bassareo V, Fenu S, De Luca MA, Spina L, Cadoni C, Acquas E, Carboni E, Valentini V, Lecca D (2004) Dopamine and drug addiction: the nucleus accumbens shell connection. Neuropharmacology 47 Suppl 1:227-241.

Di Marzo V (2008) Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? Nat Rev Drug Discov 7:438-455.

Di Marzo V, Bisogno T, De Petrocellis L (2001) Anandamide: some like it hot. Trends Pharmacol Sci 22:346-349.

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

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

Di Marzo V, Bisogno T, De Petrocellis L, Melck D, Orlando P, Wagner JA, Kunos G (1999) Biosynthesis and inactivation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in circulating and tumoral macrophages. Eur J Biochem 264:258-267.

Di Marzo V, Berrendero F, Bisogno T, Gonzalez S, Cavaliere P, Romero J, Cebeira M, Ramos JA, Fernandez-Ruiz JJ (2000) Enhancement of anandamide formation in the limbic forebrain and

reduction of endocannabinoid contents in the striatum of delta9-tetrahydrocannabinol-tolerant rats. J Neurochem 74:1627-1635.

Di S, Malcher-Lopes R, Halmos KC, Tasker JG (2003) Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. J Neurosci 23:4850-4857.

Diamond MC, Law F, Rhodes H, Lindner B, Rosenzweig MR, Krech D, Bennett EL (1966) Increases in cortical depth and glia numbers in rats subjected to enriched environment. J Comp Neurol 128:117-126.

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

Downer E, Boland B, Fogarty M, Campbell V (2001) Delta 9-tetrahydrocannabinol induces the apoptotic pathway in cultured cortical neurones via activation of the CB1 receptor. Neuroreport 12:3973-3978.

Downer EJ, Fogarty MP, Campbell VA (2003) Tetrahydrocannabinol-induced neurotoxicity depends on CB1 receptor-mediated c-Jun N-terminal kinase activation in cultured cortical neurons. Br J Pharmacol 140:547-557.

E

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

El Rawas R, Thiriet N, Lardeux V, Jaber M, Solinas M (2009) Environmental enrichment decreases the rewarding but not the activating effects of heroin. Psychopharmacology (Berl) 203:561-570.

Epstein DH, Preston KL, Stewart J, Shaham Y (2006) Toward a model of drug relapse: an assessment of the validity of the reinstatement procedure. Psychopharmacology (Berl) 189:1-16.

Erb S, Shaham Y, Stewart J (1996) Stress reinstates cocaine-seeking behavior after prolonged extinction and a drug-free period. Psychopharmacology (Berl) 128:408-412.

Erb S, Shaham Y, Stewart J (1998) The role of corticotropin-releasing factor and corticosterone in stress- and cocaine-induced relapse to cocaine seeking in rats. J Neurosci 18:5529-5536.

Esposito G, Iuvone T, Savani C, Scuderi C, De Filippis D, Papa M, Di Marzo V, Steardo L (2007) Opposing control of cannabinoid receptor stimulation on amyloid-beta-induced reactive gliosis: in vitro and in vivo evidence. J Pharmacol Exp Ther 322:1144-1152.

F

Faherty CJ, Raviie Shepherd K, Herasimtschuk A, Smeyne RJ (2005) Environmental enrichment in adulthood eliminates neuronal death in experimental Parkinsonism. Brain Res Mol Brain Res 134:170-179.

Fattore L, Martellotta MC, Cossu G, Mascia MS, Fratta W (1999) CB1 cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 decreases intravenous cocaine self-administration in rats. Behav Brain Res 104:141-146.

Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Mansouri J, Mackie K, Blond O, Lai Y, Ma AL, Mitchell RL (1995) Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. Mol Pharmacol 48:443-450.

Felder CC, Nielsen A, Briley EM, Palkovits M, Priller J, Axelrod J, Nguyen DN, Richardson JM, Riggin RM, Koppel GA, Paul SM, Becker GW (1996) Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat. FEBS Lett 393:231-235.

Feltenstein MW, See RE (2008) The neurocircuitry of addiction: an overview. Br J Pharmacol 154:261-274.

Ferchmin PA, Eterovic VA, Caputto R (1970) Studies of brain weight and RNA content after short periods of exposure to environmental complexity. Brain Res 20:49-57.

Fernandez-Ruiz J (2009) The endocannabinoid system as a target for the treatment of motor dysfunction. Br J Pharmacol 156:1029-1040.

Fernandez-Ruiz J, Romero J, Velasco G, Tolon RM, Ramos JA, Guzman M (2007) Cannabinoid CB2 receptor: a new target for controlling neural cell survival? Trends Pharmacol Sci 28:39-45.

Fernandez-Ruiz J, Moreno-Martet M, Rodriguez-Cueto C, Palomo-Garo C, Gomez-Canas M, Valdeolivas S, Guaza C, Romero J, Guzman M, Mechoulam R, Ramos JA (2011) Prospects for cannabinoid therapies in basal ganglia disorders. Br J Pharmacol 163:1365-1378.

Fezza F, Bisogno T, Minassi A, Appendino G, Mechoulam R, Di Marzo V (2002) Noladin ether, a putative novel endocannabinoid: inactivation mechanisms and a sensitive method for its quantification in rat tissues. FEBS Lett 513:294-298.

Filip M, Golda A, Zaniewska M, McCreary AC, Nowak E, Kolasiewicz W, Przegalinski E (2006) Involvement of cannabinoid CB1 receptors in drug addiction: effects of rimonabant on behavioral responses induced by cocaine. Pharmacol Rep 58:806-819.

Fischer JF, Cho AK (1979) Chemical release of dopamine from striatal homogenates: evidence for an exchange diffusion model. J Pharmacol Exp Ther 208:203-209.

Fleckenstein AE, Wilkins DG, Gibb JW, Hanson GR (1997) Interaction between hyperthermia and oxygen radical formation in the 5-hydroxytryptaminergic response to a single methamphetamine administration. J Pharmacol Exp Ther 283:281-285.

Fleckenstein AE, Volz TJ, Riddle EL, Gibb JW, Hanson GR (2007) New insights into the mechanism of action of amphetamines. Annu Rev Pharmacol Toxicol 47:681-698.

Fleming JA, Byck R, Barash PG (1990) Pharmacology and therapeutic applications of cocaine. Anesthesiology 73:518-531.

Flora G, Lee YW, Nath A, Maragos W, Hennig B, Toborek M (2002) Methamphetamine-induced TNF-alpha gene expression and activation of AP-1 in discrete regions of mouse brain: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. Neuromolecular Med 2:71-85.

Francavilla F, Battista N, Barbonetti A, Vassallo MR, Rapino C, Antonangelo C, Pasquariello N, Catanzaro G, Barboni B, Maccarrone M (2009) Characterization of the endocannabinoid system in human spermatozoa and involvement of transient receptor potential vanilloid 1 receptor in their fertilizing ability. Endocrinology 150:4692-4700.

French ED (1997) delta9-Tetrahydrocannabinol excites rat VTA dopamine neurons through activation of cannabinoid CB1 but not opioid receptors. Neurosci Lett 226:159-162.

Freund TF, Katona I, Piomelli D (2003) Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. Physiol Rev 83:1017-1066.

Fukami G, Hashimoto K, Koike K, Okamura N, Shimizu E, Iyo M (2004) Effect of antioxidant N-acetyl-L-cysteine on behavioral changes and neurotoxicity in rats after administration of methamphetamine. Brain Res 1016:90-95.

Fumagalli F, Gainetdinov RR, Valenzano KJ, Caron MG (1998) Role of dopamine transporter in methamphetamine-induced neurotoxicity: evidence from mice lacking the transporter. J Neurosci 18:4861-4869.

Fumagalli F, Gainetdinov RR, Wang YM, Valenzano KJ, Miller GW, Caron MG (1999) Increased methamphetamine neurotoxicity in heterozygous vesicular monoamine transporter 2 knock-out mice. J Neurosci 19:2424-2431.

Funk CK, O'Dell LE, Crawford EF, Koob GF (2006) Corticotropin-releasing factor within the central nucleus of the amygdala mediates enhanced ethanol self-administration in withdrawn, ethanol-dependent rats. J Neurosci 26:11324-11332.

G

Galani R, Berthel MC, Lazarus C, Majchrzak M, Barbelivien A, Kelche C, Cassel JC (2007) The behavioral effects of enriched housing are not altered by serotonin depletion but enrichment alters hippocampal neurochemistry. Neurobiol Learn Mem 88:1-10.

Gallily R, Breuer A, Mechoulam R (2000) 2-Arachidonylglycerol, an endogenous cannabinoid, inhibits tumor necrosis factor-alpha production in murine macrophages, and in mice. Eur J Pharmacol 406:R5-7.

Garcia-Arencibia M, Gonzalez S, de Lago E, Ramos JA, Mechoulam R, Fernandez-Ruiz J (2007) Evaluation of the neuroprotective effect of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: importance of antioxidant and cannabinoid receptor-independent properties. Brain Res 1134:162-170.

Garcia-Arencibia M, Garcia C, Kurz A, Rodriguez-Navarro JA, Gispert-Sachez S, Mena MA, Auburger G, de Yebenes JG, Fernandez-Ruiz J (2009) Cannabinoid CB1 receptors are early downregulated followed by a further upregulation in the basal ganglia of mice with deletion of specific park genes. J Neural Transm Suppl:269-275.

Gardner B, Zu LX, Sharma S, Liu Q, Makriyannis A, Tashkin DP, Dubinett SM (2002) Autocrine and paracrine regulation of lymphocyte CB2 receptor expression by TGF-beta. Biochem Biophys Res Commun 290:91-96.

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

Gehrke BJ, Cass WA, Bardo MT (2006) Monoamine-depleting doses of methamphetamine in enriched and isolated rats: consequences for subsequent methamphetamine-induced hyperactivity and reward. Behav Pharmacol 17:499-508.

Gerdeman G, Lovinger DM (2001) CB1 cannabinoid receptor inhibits synaptic release of glutamate in rat dorsolateral striatum. J Neurophysiol 85:468-471.

Girault JA, Valjent E, Caboche J, Herve D (2007) ERK2: a logical AND gate critical for drug-induced plasticity? Curr Opin Pharmacol 7:77-85.

Giros B, Jaber M, Jones SR, Wightman RM, Caron MG (1996) Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. Nature 379:606-612.

Giuffrida A, Parsons LH, Kerr TM, Rodriguez de Fonseca F, Navarro M, Piomelli D (1999) Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. Nat Neurosci 2:358-363.

Glaser ST, Kaczocha M, Deutsch DG (2005) Anandamide transport: a critical review. Life Sci 77:1584-1604.

Glass M, Dragunow M, Faull RL (2000) The pattern of neurodegeneration in Huntington's disease: a comparative study of cannabinoid, dopamine, adenosine and GABA(A) receptor alterations in the human basal ganglia in Huntington's disease. Neuroscience 97:505-519.

Gluck MR, Moy LY, Jayatilleke E, Hogan KA, Manzino L, Sonsalla PK (2001) Parallel increases in lipid and protein oxidative markers in several mouse brain regions after methamphetamine treatment. J Neurochem 79:152-160.

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

Goeders NE (2002) Stress and cocaine addiction. J Pharmacol Exp Ther 301:785-789.

Goeders NE, Guerin GF (1994) Non-contingent electric footshock facilitates the acquisition of intravenous cocaine self-administration in rats. Psychopharmacology (Berl) 114:63-70.

Goncalves J, Martins T, Ferreira R, Milhazes N, Borges F, Ribeiro CF, Malva JO, Macedo TR, Silva AP (2008) Methamphetamine-induced early increase of IL-6 and TNF-alpha mRNA expression in the mouse brain. Ann N Y Acad Sci 1139:103-111.

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

Gorzalka BB, Hill MN, Hillard CJ (2008) Regulation of endocannabinoid signaling by stress: implications for stress-related affective disorders. Neurosci Biobehav Rev 32:1152-1160.

Green EJ, Greenough WT (1986) Altered synaptic transmission in dentate gyrus of rats reared in complex environments: evidence from hippocampal slices maintained in vitro. J Neurophysiol 55:739-750.

Green TA, Gehrke BJ, Bardo MT (2002) Environmental enrichment decreases intravenous amphetamine self-administration in rats: dose-response functions for fixed- and progressive-ratio schedules. Psychopharmacology (Berl) 162:373-378.

Green TA, Alibhai IN, Roybal CN, Winstanley CA, Theobald DE, Birnbaum SG, Graham AR, Unterberg S, Graham DL, Vialou V, Bass CE, Terwilliger EF, Bardo MT, Nestler EJ (2009) Environmental enrichment produces a behavioral phenotype mediated by low cyclic adenosine monophosphate response element binding (CREB) activity in the nucleus accumbens. Biol Psychiatry 67:28-35.

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

Griffin G, Fernando SR, Ross RA, McKay NG, Ashford ML, Shire D, Huffman JW, Yu S, Lainton JA, Pertwee RG (1997) Evidence for the presence of CB2-like cannabinoid receptors on peripheral nerve terminals. Eur J Pharmacol 339:53-61.

Guzman M (2003) Cannabinoids: potential anticancer agents. Nat Rev Cancer 3:745-755.

H

Hampson AJ, Grimaldi M, Axelrod J, Wink D (1998) Cannabidiol and (-)Delta9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. Proc Natl Acad Sci U S A 95:8268-8273.

Hanson GR, Gibb JW, Metzger RR, Kokoshka JM, Fleckenstein AE (1998) Methamphetamine-induced rapid and reversible reduction in the activities of tryptophan hydroxylase and dopamine transporters: oxidative consequences? Ann N Y Acad Sci 844:103-107.

Hanus L, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, Kustanovich I, Mechoulam R (2001) 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. Proc Natl Acad Sci U S A 98:3662-3665.

Harrison PA, Fulkerson JA, Beebe TJ (1997) Multiple substance use among adolescent physical and sexual abuse victims. Child Abuse Negl 21:529-539.

Hayakawa K, Mishima K, Irie K, Hazekawa M, Mishima S, Fujioka M, Orito K, Egashira N, Katsurabayashi S, Takasaki K, Iwasaki K, Fujiwara M (2008) Cannabidiol prevents a post-ischemic injury progressively induced by cerebral ischemia via a high-mobility group box1-inhibiting mechanism. Neuropharmacology 55:1280-1286.

Hebb DO (1947) The effects of early experience on problem solving at maturity. Am Psychol 2:306-307.

Heesch CM, Negus BH, Keffer JH, Snyder RW, 2nd, Risser RC, Eichhorn EJ (1995) Effects of cocaine on cortisol secretion in humans. Am J Med Sci 310:61-64.

Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC (1991) Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. J Neurosci 11:563-583.

Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC (1990) Cannabinoid receptor localization in brain. Proc Natl Acad Sci U S A 87:1932-1936.

Herman JP, Ostrander MM, Mueller NK, Figueiredo H (2005) Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 29:1201-1213.

Herring A, Blome M, Ambree O, Sachser N, Paulus W, Keyvani K (2009) Reduction of cerebral oxidative stress following environmental enrichment in mice with Alzheimer-like pathology. Brain Pathol 20:166-175.

Hill MN, Patel S, Carrier EJ, Rademacher DJ, Ormerod BK, Hillard CJ, Gorzalka BB (2005b) Downregulation of endocannabinoid signaling in the hippocampus following chronic unpredictable stress. Neuropsychopharmacology 30:508-515.

Hillard CJ, Edgemond WS, Jarrahian A, Campbell WB (1997) Accumulation of N-arachidonoylethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion. J Neurochem 69:631-638.

Hirata H, Cadet JL (1997) p53-knockout mice are protected against the long-term effects of methamphetamine on dopaminergic terminals and cell bodies. J Neurochem 69:780-790.

Hogan KA, Staal RG, Sonsalla PK (2000) Analysis of VMAT2 binding after methamphetamine or MPTP treatment: disparity between homogenates and vesicle preparations. J Neurochem 74:2217-2220.

Hope B, Kosofsky B, Hyman SE, Nestler EJ (1992) Regulation of immediate early gene expression and AP-1 binding in the rat nucleus accumbens by chronic cocaine. Proc Natl Acad Sci U S A 89:5764-5768.

Howlett AC, Fleming RM (1984) Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. Mol Pharmacol 26:532-538.

Howlett AC, Qualy JM, Khachatrian LL (1986) Involvement of Gi in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs. Mol Pharmacol 29:307-313.

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

Hyman SE (1996) Addiction to cocaine and amphetamine. Neuron 16:901-904.

I

Ickes BR, Pham TM, Sanders LA, Albeck DS, Mohammed AH, Granholm AC (2000) Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain. Exp Neurol 164:45-52.

Ikemoto S (2003) Involvement of the olfactory tubercle in cocaine reward: intracranial self-administration studies. J Neurosci 23:9305-9311.

Ikemoto S, Goeders NE (1998) Microinjections of dopamine agonists and cocaine elevate plasma corticosterone: dissociation effects among the ventral and dorsal striatum and medial prefrontal cortex. Brain Res 814:171-178.

Ikemoto S, Qin M, Liu ZH (2005) The functional divide for primary reinforcement of D-amphetamine lies between the medial and lateral ventral striatum: is the division of the accumbens core, shell, and olfactory tubercle valid? J Neurosci 25:5061-5065.

Imam SZ, Itzhak Y, Cadet JL, Islam F, Slikker W, Jr., Ali SF (2001a) Methamphetamine-induced alteration in striatal p53 and bcl-2 expressions in mice. Brain Res Mol Brain Res 91:174-178.

Imam SZ, Newport GD, Itzhak Y, Cadet JL, Islam F, Slikker W, Jr., Ali SF (2001b) Peroxynitrite plays a role in methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity: evidence from mice lacking neuronal nitric oxide synthase gene or overexpressing copper-zinc superoxide dismutase. J Neurochem 76:745-749.

Itzhak Y, Ali SF (1996) The neuronal nitric oxide synthase inhibitor, 7-nitroindazole, protects against methamphetamine-induced neurotoxicity in vivo. J Neurochem 67:1770-1773.

J

Jaber M, Robinson SW, Missale C, Caron MG (1996) Dopamine receptors and brain function. Neuropharmacology 35:1503-1519.

Jacobsen LK, Southwick SM, Kosten TR (2001) Substance use disorders in patients with posttraumatic stress disorder: a review of the literature. Am J Psychiatry 158:1184-1190.

Jadavji NM, Kolb B, Metz GA (2006) Enriched environment improves motor function in intact and unilateral dopamine-depleted rats. Neuroscience 140:1127-1138.

Jayanthi S, Deng X, Bordelon M, McCoy MT, Cadet JL (2001) Methamphetamine causes differential regulation of pro-death and anti-death Bcl-2 genes in the mouse neocortex. Faseb J 15:1745-1752.

Jayanthi S, Deng X, Noailles PA, Ladenheim B, Cadet JL (2004) Methamphetamine induces neuronal apoptosis via cross-talks between endoplasmic reticulum and mitochondria-dependent death cascades. Faseb J 18:238-251.

Jayanthi S, Deng X, Ladenheim B, McCoy MT, Cluster A, Cai NS, Cadet JL (2005) Calcineurin/NFAT-induced up-regulation of the Fas ligand/Fas death pathway is involved in methamphetamine-induced neuronal apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A 102:868-873.

Jessor R, Jessor S (1980) A social-psychological framework for studying drug use. NIDA Res Monogr 30:102-109.

Johanson CE, Fischman MW (1989) The pharmacology of cocaine related to its abuse. Pharmacol Rev 41:3-52.

Johanson CE, Frey KA, Lundahl LH, Keenan P, Lockhart N, Roll J, Galloway GP, Koeppe RA, Kilbourn MR, Robbins T, Schuster CR (2006) Cognitive function and nigrostriatal markers in abstinent methamphetamine abusers. Psychopharmacology (Berl) 185:327-338.

Justinova Z, Tanda G, Redhi GH, Goldberg SR (2003) Self-administration of delta9-tetrahydrocannabinol (THC) by drug naive squirrel monkeys. Psychopharmacology (Berl) 169:135-140.

Justinova Z, Goldberg SR, Heishman SJ, Tanda G (2005b) Self-administration of cannabinoids by experimental animals and human marijuana smokers. Pharmacol Biochem Behav 81:285-299.

Justinova Z, Solinas M, Tanda G, Redhi GH, Goldberg SR (2005a) The endogenous cannabinoid anandamide and its synthetic analog R(+)-methanandamide are intravenously self-administered by squirrel monkeys. J Neurosci 25:5645-5650.

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

K

Kalivas PW, Duffy P (1995) D1 receptors modulate glutamate transmission in the ventral tegmental area. J Neurosci 15:5379-5388.

Kalivas PW, O'Brien C (2008) Drug addiction as a pathology of staged neuroplasticity. Neuropsychopharmacology 33:166-180.

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

Katona I, Rancz EA, Acsady L, Ledent C, Mackie K, Hajos N, Freund TF (2001) Distribution of CB1 cannabinoid receptors in the amygdala and their role in the control of GABAergic transmission. J Neurosci 21:9506-9518.

Kauer JA, Malenka RC (2007) Synaptic plasticity and addiction. Nat Rev Neurosci 8:844-858.

Kelz MB, Nestler EJ (2000) deltaFosB: a molecular switch underlying long-term neural plasticity. Curr Opin Neurol 13:715-720.

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

Kita T, Miyazaki I, Asanuma M, Takeshima M, Wagner GC (2009) Dopamine-induced behavioral changes and oxidative stress in methamphetamine-induced neurotoxicity. Int Rev Neurobiol 88:43-64.

Klegeris A, Bissonnette CJ, McGeer PL (2003) Reduction of human monocytic cell neurotoxicity and cytokine secretion by ligands of the cannabinoid-type CB2 receptor. Br J Pharmacol 139:775-786.

Kleim JA, Jones TA, Schallert T (2003) Motor enrichment and the induction of plasticity before or after brain injury. Neurochem Res 28:1757-1769.

Kokoshka JM, Vaughan RA, Hanson GR, Fleckenstein AE (1998) Nature of methamphetamine-induced rapid and reversible changes in dopamine transporters. Eur J Pharmacol 361:269-275.

Koob GF, Le Moal M (1997) Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. Science 278:52-58.

Koob GF, Le Moal M (2001) Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. Neuropsychopharmacology 24:97-129.

Koob GF, Le Moal M (2005) Plasticity of reward neurocircuitry and the 'dark side' of drug addiction. Nat Neurosci 8:1442-1444.

Koob GF, Le Moal M (2006) Neurobiology of Addiction, 1st Edition: Elsevier Inc.

Koob GF, Volkow ND (2010) Neurocircuitry of addiction. Neuropsychopharmacology 35:217-238.
Koob GF, Sanna PP, Bloom FE (1998) Neuroscience of addiction. Neuron 21:467-476.
Krasnova IN, Cadet JL (2009) Methamphetamine toxicity and messengers of death. Brain Res Rev 60:379-407.
Kreek MJ, LaForge KS, Butelman E (2002) Pharmacotherapy of addictions. Nat Rev Drug Discov 1:710-726.
Kreek MJ, Nielsen DA, Butelman ER, LaForge KS (2005) Genetic influences on impulsivity, risk taking, stress responsivity and vulnerability to drug abuse and addiction. Nat Neurosci 8:1450-1457.
Kreitzer AC, Carter AG, Regehr WG (2002) Inhibition of interneuron firing extends the spread of endocannabinoid signaling in the cerebellum. Neuron 34:787-796.
Kufahl PR, Li Z, Risinger RC, Rainey CJ, Wu G, Bloom AS, Li SJ (2005) Neural responses to acute cocaine administration in the human brain detected by fMRI. Neuroimage 28:904-914.
Kuhn DM, Francescutti-Verbeem DM, Thomas DM (2006) Dopamine quinones activate microglia and induce a neurotoxic gene expression profile: relationship to methamphetamine-induced nerve ending damage. Ann N Y Acad Sci 1074:31-41.
Kuhn DM, Arthur RE, Jr., Thomas DM, Elferink LA (1999) Tyrosine hydroxylase is inactivated by catechol-quinones and converted to a redox-cycling quinoprotein: possible relevance to Parkinson's disease. J Neurochem 73:1309-1317.

L

Ladenheim B, Krasnova IN, Deng X, Oyler JM, Polettini A, Moran TH, Huestis MA, Cadet JL (2000) Methamphetamine-induced neurotoxicity is attenuated in transgenic mice with a null mutation for interleukin-6. Mol Pharmacol 58:1247-1256.
Lastres-Becker I, Molina-Holgado F, Ramos JA, Mechoulam R, Fernandez-Ruiz J (2005) Cannabinoids provide neuroprotection against 6-hydroxydopamine toxicity in vivo and in vitro: relevance to Parkinson's disease. Neurobiol Dis 19:96-107.
Lastres-Becker I, Cebeira M, de Ceballos ML, Zeng BY, Jenner P, Ramos JA, Fernandez-Ruiz JJ (2001) Increased cannabinoid CB1 receptor binding and activation of GTP-binding proteins in the basal ganglia of patients with Parkinson's syndrome and of MPTP-treated marmosets. Eur J Neurosci 14:1827-1832.
Laviola G, Hannan AJ, Macri S, Solinas M, Jaber M (2008) Effects of enriched environment on animal models of neurodegenerative diseases and psychiatric disorders. Neurobiol Dis 31:159-168.
LaVoie MJ, Hastings TG (1999) Dopamine quinone formation and protein modification associated with the striatal neurotoxicity of methamphetamine: evidence against a role for extracellular dopamine. J Neurosci 19:1484-1491.
LaVoie MJ, Card JP, Hastings TG (2004) Microglial activation precedes dopamine terminal pathology in methamphetamine-induced neurotoxicity. Exp Neurol 187:47-57.
Ledent C, Valverde O, Cossu G, Petitet F, Aubert JF, Beslot F, Bohme GA, Imperato A, Pedrazzini T, Roques BP, Vassart G, Fratta W, Parmentier M (1999) Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. Science 283:401-404.
Lee B, Tiefenbacher S, Platt DM, Spealman RD (2004) Pharmacological blockade of alpha2-adrenoceptors induces reinstatement of cocaine-seeking behavior in squirrel monkeys. Neuropsychopharmacology 29:686-693.

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

Liao H, Bu WY, Wang TH, Ahmed S, Xiao ZC (2005) Tenascin-R plays a role in neuroprotection via its distinct domains that coordinate to modulate the microglia function. J Biol Chem 280:8316-8323.

Liu J, Wang L, Harvey-White J, Osei-Hyiaman D, Razdan R, Gong Q, Chan AC, Zhou Z, Huang BX, Kim HY, Kunos G (2006) A biosynthetic pathway for anandamide. Proc Natl Acad Sci U S A 103:13345-13350.

London ED, Simon SL, Berman SM, Mandelkern MA, Lichtman AM, Bramen J, Shinn AK, Miotto K, Learn J, Dong Y, Matochik JA, Kurian V, Newton T, Woods R, Rawson R, Ling W (2004) Mood disturbances and regional cerebral metabolic abnormalities in recently abstinent methamphetamine abusers. Arch Gen Psychiatry 61:73-84.

Long JZ, Li W, Booker L, Burston JJ, Kinsey SG, Schlosburg JE, Pavon FJ, Serrano AM, Selley DE, Parsons LH, Lichtman AH, Cravatt BF (2009) Selective blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis produces cannabinoid behavioral effects. Nat Chem Biol 5:37-44.

Lowy MT, Gault L, Yamamoto BK (1993) Adrenalectomy attenuates stress-induced elevations in extracellular glutamate concentrations in the hippocampus. J Neurochem 61:1957-1960.

Lyman WD, Sonett JR, Brosnan CF, Elkin R, Bornstein MB (1989) Delta 9-tetrahydrocannabinol: a novel treatment for experimental autoimmune encephalomyelitis. J Neuroimmunol 23:73-81.

M

Maccarrone M, Lorenzon T, Bari M, Melino G, Finazzi-Agro A (2000) Anandamide induces apoptosis in human cells via vanilloid receptors. Evidence for a protective role of cannabinoid receptors. J Biol Chem 275:31938-31945.

Maccarrone M, De Petrocellis L, Bari M, Fezza F, Salvati S, Di Marzo V, Finazzi-Agro A (2001) Lipopolysaccharide downregulates fatty acid amide hydrolase expression and increases anandamide levels in human peripheral lymphocytes. Arch Biochem Biophys 393:321-328.

Mackie K, Hille B (1992) Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. Proc Natl Acad Sci U S A 89:3825-3829.

Mackie K, Lai Y, Westenbroek R, Mitchell R (1995) Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. J Neurosci 15:6552-6561.

Madrigal JL, Olivenza R, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Rodrigo J, Leza JC (2001) Glutathione depletion, lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction are induced by chronic stress in rat brain. Neuropsychopharmacology 24:420-429.

Maisonneuve IM, Keller RW, Glick SD (1990) Similar effects of D-amphetamine and cocaine on extracellular dopamine levels in medial prefrontal cortex of rats. Brain Res 535:221-226.

Mantsch JR, Goeders NE (1999) Ketoconazole blocks the stress-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior in rats: relationship to the discriminative stimulus effects of cocaine. Psychopharmacology (Berl) 142:399-407.

Mantsch JR, Goeders NE (2000) Effects of cocaine self-administration on plasma corticosterone in rats: relationship to hippocampal type II glucocorticoid receptors. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 24:633-646.

Mantsch JR, Saphier D, Goeders NE (1998) Corticosterone facilitates the acquisition of cocaine self-administration in rats: opposite effects of the type II glucocorticoid receptor agonist dexamethasone. J Pharmacol Exp Ther 287:72-80.

Marinelli M, Piazza PV (2002) Interaction between glucocorticoid hormones, stress and psychostimulant drugs. Eur J Neurosci 16:387-394.

Mark KA, Soghomonian JJ, Yamamoto BK (2004) High-dose methamphetamine acutely activates the striatonigral pathway to increase striatal glutamate and mediate long-term dopamine toxicity. J Neurosci 24:11449-11456.

Marshall M (1995) Interactions between Ras and Raf: key regulatory proteins in cellular transformation. Mol Reprod Dev 42:493-499.

Marsicano G, Wotjak CT, Azad SC, Bisogno T, Rammes G, Cascio MG, Hermann H, Tang J, Hofmann C, Zieglgansberger W, Di Marzo V, Lutz B (2002) The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. Nature 418:530-534.

Martin M, Ledent C, Parmentier M, Maldonado R, Valverde O (2000) Cocaine, but not morphine, induces conditioned place preference and sensitization to locomotor responses in CB1 knockout mice. Eur J Neurosci 12:4038-4046.

Martin M, Ledent C, Parmentier M, Maldonado R, Valverde O (2002) Involvement of CB1 cannabinoid receptors in emotional behaviour. Psychopharmacology (Berl) 159:379-387.

Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. Nature 346:561-564.

Matsumoto K, Yobimoto K, Huong NT, Abdel-Fattah M, Van Hien T, Watanabe H (1999) Psychological stress-induced enhancement of brain lipid peroxidation via nitric oxide systems and its modulation by anxiolytic and anxiogenic drugs in mice. Brain Res 839:74-84.

Matuszewich L, Yamamoto BK (2004a) Chronic stress augments the long-term and acute effects of methamphetamine. Neuroscience 124:637-646.

Matuszewich L, Yamamoto BK (2004b) Effects of chronic stress on methamphetamine-induced dopamine depletions in the striatum. Ann N Y Acad Sci 1032:312-314.

McCann UD, Wong DF, Yokoi F, Villemagne V, Dannals RF, Ricaurte GA (1998) Reduced striatal dopamine transporter density in abstinent methamphetamine and methcathinone users: evidence from positron emission tomography studies with [11C]WIN-35,428. J Neurosci 18:8417-8422.

McCarron RM, Shohami E, Panikashvili D, Chen Y, Golech S, Strasser A, Mechoulam R, Spatz M (2003) Antioxidant properties of the vasoactive endocannabinoid, 2-arachidonoyl glycerol (2-AG). Acta Neurochir Suppl 86:271-275.

McEwen BS (2000) The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. Brain Res 886:172-189.

McEwen BS (2007) Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. Physiol Rev 87:873-904.

McEwen BS, De Kloet ER, Rostene W (1986) Adrenal steroid receptors and actions in the nervous system. Physiol Rev 66:1121-1188.

McFarland MJ, Barker EL (2004) Anandamide transport. Pharmacol Ther 104:117-135.

McIntosh LJ, Sapolsky RM (1996) Glucocorticoids increase the accumulation of reactive oxygen species and enhance adriamycin-induced toxicity in neuronal culture. Exp Neurol 141:201-206.

McIntosh LJ, Cortopassi KM, Sapolsky RM (1998) Glucocorticoids may alter antioxidant enzyme capacity in the brain: kainic acid studies. Brain Res 791:215-222.

McKay JR, Rutherford MJ, Alterman AI, Cacciola JS, Kaplan MR (1995) An examination of the cocaine relapse process. Drug Alcohol Depend 38:35-43.

McLaughlin JP, Marton-Popovici M, Chavkin C (2003) Kappa opioid receptor antagonism and prodynorphin gene disruption block stress-induced behavioral responses. J Neurosci 23:5674-5683.

McLaughlin JP, Li S, Valdez J, Chavkin TA, Chavkin C (2006) Social defeat stress-induced behavioral responses are mediated by the endogenous kappa opioid system. Neuropsychopharmacology 31:1241-1248.

McNair K, Broad J, Riedel G, Davies CH, Cobb SR (2007) Global changes in the hippocampal proteome following exposure to an enriched environment. Neuroscience 145:413-422.

Mechoulam R, Fride E, Di Marzo V (1998) Endocannabinoids. Eur J Pharmacol 359:1-18.

Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. Biochem Pharmacol 50:83-90.

Melega WP, Lacan G, Desalles AA, Phelps ME (2000) Long-term methamphetamine-induced decreases of [(11)C]WIN 35,428 binding in striatum are reduced by GDNF: PET studies in the vervet monkey. Synapse 35:243-249.

Melega WP, Raleigh MJ, Stout DB, Lacan G, Huang SC, Phelps ME (1997) Recovery of striatal dopamine function after acute amphetamine- and methamphetamine-induced neurotoxicity in the vervet monkey. Brain Res 766:113-120.

Melega WP, Jorgensen MJ, Lacan G, Way BM, Pham J, Morton G, Cho AK, Fairbanks LA (2008) Long-term methamphetamine administration in the vervet monkey models aspects of a human exposure: brain neurotoxicity and behavioral profiles. Neuropsychopharmacology 33:1441-1452.

Melis M, Pillolla G, Bisogno T, Minassi A, Petrosino S, Perra S, Muntoni AL, Lutz B, Gessa GL, Marsicano G, Di Marzo V, Pistis M (2006) Protective activation of the endocannabinoid system during ischemia in dopamine neurons. Neurobiol Dis 24:15-27.

Moghaddam B, Bolinao ML, Stein-Behrens B, Sapolsky R (1994) Glucocorticoids mediate the stress-induced extracellular accumulation of glutamate. Brain Res 655:251-254.

Moldrich G, Wenger T (2000) Localization of the CB1 cannabinoid receptor in the rat brain. An immunohistochemical study. Peptides 21:1735-1742.

Moszczynska A, Fitzmaurice P, Ang L, Kalasinsky KS, Schmunk GA, Peretti FJ, Aiken SS, Wickham DJ, Kish SJ (2004) Why is parkinsonism not a feature of human methamphetamine users? Brain 127:363-370.

Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. Nature 365:61-65.

N

Nagayama T, Sinor AD, Simon RP, Chen J, Graham SH, Jin K, Greenberg DA (1999) Cannabinoids and neuroprotection in global and focal cerebral ischemia and in neuronal cultures. J Neurosci 19:2987-2995.

Naidu PS, Varvel SA, Ahn K, Cravatt BF, Martin BR, Lichtman AH (2007) Evaluation of fatty acid amide hydrolase inhibition in murine models of emotionality. Psychopharmacology (Berl) 192:61-70.

Naka F, Narita N, Okado N, Narita M (2005) Modification of AMPA receptor properties following environmental enrichment. Brain Dev 27:275-278.

Nakajima A, Yamada K, Nagai T, Uchiyama T, Miyamoto Y, Mamiya T, He J, Nitta A, Mizuno M, Tran MH, Seto A, Yoshimura M, Kitaichi K, Hasegawa T, Saito K, Yamada Y, Seishima M, Sekikawa

K, Kim HC, Nabeshima T (2004) Role of tumor necrosis factor-alpha in methamphetamine-induced drug dependence and neurotoxicity. J Neurosci 24:2212-2225.
Nash JF, Yamamoto BK (1992) Methamphetamine neurotoxicity and striatal glutamate release: comparison to 3,4-methylenedioxymethamphetamine. Brain Res 581:237-243.
Nestler EJ (2001) Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. Nat Rev Neurosci 2:119-128.
Nestler EJ (2004) Historical review: Molecular and cellular mechanisms of opiate and cocaine addiction. Trends Pharmacol Sci 25:210-218.
Nestler EJ, Aghajanian GK (1997) Molecular and cellular basis of addiction. Science 278:58-63.
Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM (2002) Neurobiology of depression. Neuron 34:13-25.
Newcomb MD, Bentler PM (1988) Impact of adolescent drug use and social support on problems of young adults: a longitudinal study. J Abnorm Psychol 97:64-75.
Newton SS, Thome J, Wallace TL, Shirayama Y, Schlesinger L, Sakai N, Chen J, Neve R, Nestler EJ, Duman RS (2002) Inhibition of cAMP response element-binding protein or dynorphin in the nucleus accumbens produces an antidepressant-like effect. J Neurosci 22:10883-10890.
Nibuya M, Morinobu S, Duman RS (1995) Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. J Neurosci 15:7539-7547.
Nibuya M, Nestler EJ, Duman RS (1996) Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus. J Neurosci 16:2365-2372.
Nithianantharajah J, Hannan AJ (2006) Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. Nat Rev Neurosci 7:697-709.
Nithianantharajah J, Hannan AJ (2009) The neurobiology of brain and cognitive reserve: mental and physical activity as modulators of brain disorders. Prog Neurobiol 89:369-382.
Numachi Y, Ohara A, Yamashita M, Fukushima S, Kobayashi H, Hata H, Watanabe H, Hall FS, Lesch KP, Murphy DL, Uhl GR, Sora I (2007) Methamphetamine-induced hyperthermia and lethal toxicity: role of the dopamine and serotonin transporters. Eur J Pharmacol 572:120-128.

O

O'Callaghan JP, Miller DB (1994) Neurotoxicity profiles of substituted amphetamines in the C57BL/6J mouse. J Pharmacol Exp Ther 270:741-751.
O'Callaghan RM, Griffin EW, Kelly AM (2009) Long-term treadmill exposure protects against age-related neurodegenerative change in the rat hippocampus. Hippocampus 19:1019-1029.
OEDT OEdDeT (2006) Etat du Phénomène de la drogue en Europe. Rapport annuel 2006. Observatoire Européen des Drogues et des Toxicomanies http://www.ofdt.fr/BDD/publications/docs/NR06rapp.pdf.
Olson VG, Zabetian CP, Bolanos CA, Edwards S, Barrot M, Eisch AJ, Hughes T, Self DW, Neve RL, Nestler EJ (2005) Regulation of drug reward by cAMP response element-binding protein: evidence for two functionally distinct subregions of the ventral tegmental area. J Neurosci 25:5553-5562.
Onaivi ES, Ishiguro H, Gu S, Liu QR (2012) CNS effects of CB2 cannabinoid receptors: beyond neuro-immuno-cannabinoid activity. J Psychopharmacol 26:92-103.
Onaivi ES, Ishiguro H, Gong JP, Patel S, Perchuk A, Meozzi PA, Myers L, Mora Z, Tagliaferro P, Gardner E, Brusco A, Akinshola BE, Liu QR, Hope B, Iwasaki S, Arinami T, Teasenfitz L, Uhl GR (2006)

Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. Ann N Y Acad Sci 1074:514-536.

Overstreet DH, Moy SS, Lubin DA, Gause LR, Lieberman JA, Johns JM (2000) Enduring effects of prenatal cocaine administration on emotional behavior in rats. Physiol Behav 70:149-156.

P

Parmentier-Batteur S, Jin K, Mao XO, Xie L, Greenberg DA (2002) Increased severity of stroke in CB1 cannabinoid receptor knock-out mice. J Neurosci 22:9771-9775.

Patel S, Roelke CT, Rademacher DJ, Hillard CJ (2005) Inhibition of restraint stress-induced neural and behavioural activation by endogenous cannabinoid signalling. Eur J Neurosci 21:1057-1069.

Patel S, Roelke CT, Rademacher DJ, Cullinan WE, Hillard CJ (2004) Endocannabinoid signaling negatively modulates stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Endocrinology 145:5431-5438.

Peakman MC, Colby C, Perrotti LI, Tekumalla P, Carle T, Ulery P, Chao J, Duman C, Steffen C, Monteggia L, Allen MR, Stock JL, Duman RS, McNeish JD, Barrot M, Self DW, Nestler EJ, Schaeffer E (2003) Inducible, brain region-specific expression of a dominant negative mutant of c-Jun in transgenic mice decreases sensitivity to cocaine. Brain Res 970:73-86.

Pertwee RG (2001a) Cannabinoid receptors and pain. Prog Neurobiol 63:569-611.

Pertwee RG (2001b) Cannabinoids and the gastrointestinal tract. Gut 48:859-867.

Phillips GD, Howes SR, Whitelaw RB, Wilkinson LS, Robbins TW, Everitt BJ (1994) Isolation rearing enhances the locomotor response to cocaine and a novel environment, but impairs the intravenous self-administration of cocaine. Psychopharmacology (Berl) 115:407-418.

Phillips PE, Stuber GD, Heien ML, Wightman RM, Carelli RM (2003) Subsecond dopamine release promotes cocaine seeking. Nature 422:614-618.

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.

Piazza PV, Le Moal M (1998) The role of stress in drug self-administration. Trends Pharmacol Sci 19:67-74.

Piazza PV, Maccari S, Deminiere JM, Le Moal M, Mormede P, Simon H (1991) Corticosterone levels determine individual vulnerability to amphetamine self-administration. Proc Natl Acad Sci U S A 88:2088-2092.

Piazza PV, Rouge-Pont F, Deroche V, Maccari S, Simon H, Le Moal M (1996a) Glucocorticoids have state-dependent stimulant effects on the mesencephalic dopaminergic transmission. Proc Natl Acad Sci U S A 93:8716-8720.

Piazza PV, Barrot M, Rouge-Pont F, Marinelli M, Maccari S, Abrous DN, Simon H, Le Moal M (1996b) Suppression of glucocorticoid secretion and antipsychotic drugs have similar effects on the mesolimbic dopaminergic transmission. Proc Natl Acad Sci U S A 93:15445-15450.

Piomelli D (2003) The molecular logic of endocannabinoid signalling. Nat Rev Neurosci 4:873-884.

Piomelli D, Beltramo M, Glasnapp S, Lin SY, Goutopoulos A, Xie XQ, Makriyannis A (1999) Structural determinants for recognition and translocation by the anandamide transporter. Proc Natl Acad Sci U S A 96:5802-5807.

Pliakas AM, Carlson RR, Neve RL, Konradi C, Nestler EJ, Carlezon WA, Jr. (2001) Altered responsiveness to cocaine and increased immobility in the forced swim test associated with elevated cAMP response element-binding protein expression in nucleus accumbens. J Neurosci 21:7397-7403.

Pontieri FE, Tanda G, Di Chiara G (1995) Intravenous cocaine, morphine, and amphetamine preferentially increase extracellular dopamine in the "shell" as compared with the "core" of the rat nucleus accumbens. Proc Natl Acad Sci U S A 92:12304-12308.

Porter AC, Sauer JM, Knierman MD, Becker GW, Berna MJ, Bao J, Nomikos GG, Carter P, Bymaster FP, Leese AB, Felder CC (2002) Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. J Pharmacol Exp Ther 301:1020-1024.

Preston KL, Schuster CR, Seiden LS (1985b) Methamphetamine, physostigmine, atropine and mecamylamine: effects on force lever performance. Pharmacol Biochem Behav 23:781-788.

Preston KL, Wagner GC, Schuster CR, Seiden LS (1985a) Long-term effects of repeated methylamphetamine administration on monoamine neurons in the rhesus monkey brain. Brain Res 338:243-248.

Pubill D, Verdaguer E, Sureda FX, Camins A, Pallas M, Camarasa J, Escubedo E (2002) Carnosine prevents methamphetamine-induced gliosis but not dopamine terminal loss in rats. Eur J Pharmacol 448:165-168.

Q

Quinton MS, Yamamoto BK (2006) Causes and consequences of methamphetamine and MDMA toxicity. AAPS J 8:E337-347.

R

Raborn ES, Marciano-Cabral F, Buckley NE, Martin BR, Cabral GA (2008) The cannabinoid delta-9-tetrahydrocannabinol mediates inhibition of macrophage chemotaxis to RANTES/CCL5: linkage to the CB2 receptor. J Neuroimmune Pharmacol 3:117-129.

Rademacher DJ, Hillard CJ (2007) Interactions between endocannabinoids and stress-induced decreased sensitivity to natural reward. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 31:633-641.

Rademacher DJ, Meier SE, Shi L, Ho WS, Jarrahian A, Hillard CJ (2008) Effects of acute and repeated restraint stress on endocannabinoid content in the amygdala, ventral striatum, and medial prefrontal cortex in mice. Neuropharmacology 54:108-116.

Radley JJ, Sisti HM, Hao J, Rocher AB, McCall T, Hof PR, McEwen BS, Morrison JH (2004) Chronic behavioral stress induces apical dendritic reorganization in pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex. Neuroscience 125:1-6.

Ramirez BG, Blazquez C, Gomez del Pulgar T, Guzman M, de Ceballos ML (2005) Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglial activation. J Neurosci 25:1904-1913.

Rampon C, Tang YP, Goodhouse J, Shimizu E, Kyin M, Tsien JZ (2000b) Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. Nat Neurosci 3:238-244.

Rampon C, Jiang CH, Dong H, Tang YP, Lockhart DJ, Schultz PG, Tsien JZ, Hu Y (2000a) Effects of environmental enrichment on gene expression in the brain. Proc Natl Acad Sci U S A 97:12880-12884.

Ramsey NF, Van Ree JM (1993) Emotional but not physical stress enhances intravenous cocaine self-administration in drug-naive rats. Brain Res 608:216-222.

Rasmuson S, Olsson T, Henriksson BG, Kelly PA, Holmes MC, Seckl JR, Mohammed AH (1998) Environmental enrichment selectively increases 5-HT1A receptor mRNA expression and binding in the rat hippocampus. Brain Res Mol Brain Res 53:285-290.

Reith ME, Li MY, Yan QS (1997) Extracellular dopamine, norepinephrine, and serotonin in the ventral tegmental area and nucleus accumbens of freely moving rats during intracerebral dialysis following systemic administration of cocaine and other uptake blockers. Psychopharmacology (Berl) 134:309-317.

Ricaurte GA, Guillery RW, Seiden LS, Schuster CR, Moore RY (1982) Dopamine nerve terminal degeneration produced by high doses of methylamphetamine in the rat brain. Brain Res 235:93-103.

Richter RM, Pich EM, Koob GF, Weiss F (1995) Sensitization of cocaine-stimulated increase in extracellular levels of corticotropin-releasing factor from the rat amygdala after repeated administration as determined by intracranial microdialysis. Neurosci Lett 187:169-172.

Riddle EL, Fleckenstein AE, Hanson GR (2006) Mechanisms of methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity. Aaps J 8:E413-418.

Riddle EL, Topham MK, Haycock JW, Hanson GR, Fleckenstein AE (2002) Differential trafficking of the vesicular monoamine transporter-2 by methamphetamine and cocaine. Eur J Pharmacol 449:71-74.

Rinaldi-Carmona M, Barth F, Heaulme M, Shire D, Calandra B, Congy C, Martinez S, Maruani J, Neliat G, Caput D, et al. (1994) SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. FEBS Lett 350:240-244.

Robbins TW, Everitt BJ (1996) Neurobehavioural mechanisms of reward and motivation. Curr Opin Neurobiol 6:228-236.

Roberts DC, Koob GF, Klonoff P, Fibiger HC (1980) Extinction and recovery of cocaine self-administration following 6-hydroxydopamine lesions of the nucleus accumbens. Pharmacol Biochem Behav 12:781-787.

Robinson TE, Berridge KC (2003) Addiction. Annu Rev Psychol 54:25-53.

Roche M, Kelly JP, O'Driscoll M, Finn DP (2008) Augmentation of endogenous cannabinoid tone modulates lipopolysaccharide-induced alterations in circulating cytokine levels in rats. Immunology 125:263-271.

Rosenzweig MR, Bennett EL (1969) Effects of differential environments on brain weights and enzyme activities in gerbils, rats, and mice. Dev Psychobiol 2:87-95.

Rosenzweig MR, Bennett EL (1996) Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. Behav Brain Res 78:57-65.

Rosenzweig MR, Bennett EL, Hebert M, Morimoto H (1978) Social grouping cannot account for cerebral effects of enriched environments. Brain Res 153:563-576.

Rossi S, De Chiara V, Musella A, Kusayanagi H, Mataluni G, Bernardi G, Usiello A, Centonze D (2008) Chronic psychoemotional stress impairs cannabinoid-receptor-mediated control of GABA transmission in the striatum. J Neurosci 28:7284-7292.

Rueda D, Galve-Roperh I, Haro A, Guzman M (2000) The CB(1) cannabinoid receptor is coupled to the activation of c-Jun N-terminal kinase. Mol Pharmacol 58:814-820.

Ryan LJ, Linder JC, Martone ME, Groves PM (1990) Histological and ultrastructural evidence that D-amphetamine causes degeneration in neostriatum and frontal cortex of rats. Brain Res 518:67-77.

Ryberg E, Larsson N, Sjogren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T, Greasley PJ (2007) The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. Br J Pharmacol 152:1092-1101.

S

Salo R, Flower K, Kielstein A, Leamon MH, Nordahl TE, Galloway GP (2011) Psychiatric comorbidity in methamphetamine dependence. Psychiatry Res 186:356-361.

Samantaray S, Ray SK, Ali SF, Banik NL (2006) Calpain activation in apoptosis of motoneurons in cell culture models of experimental parkinsonism. Ann N Y Acad Sci 1074:349-356.

Sanchez C (1989) The effects of dopamine D-1 and D-2 receptor agonists on body temperature in male mice. Eur J Pharmacol 171:201-206.

Saphier D, Welch JE, Farrar GE, Goeders NE (1993) Effects of intracerebroventricular and intrahypothalamic cocaine administration on adrenocortical secretion. Neuroendocrinology 57:54-62.

Sapolsky RM (1985) A mechanism for glucocorticoid toxicity in the hippocampus: increased neuronal vulnerability to metabolic insults. J Neurosci 5:1228-1232.

Sapolsky RM (1999) Glucocorticoids, stress, and their adverse neurological effects: relevance to aging. Exp Gerontol 34:721-732.

Sapolsky RM (2003) Stress and plasticity in the limbic system. Neurochem Res 28:1735-1742.

Sapolsky RM, Pulsinelli WA (1985) Glucocorticoids potentiate ischemic injury to neurons: therapeutic implications. Science 229:1397-1400.

Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU (2000) How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. Endocr Rev 21:55-89.

Sarker KP, Biswas KK, Yamakuchi M, Lee KY, Hahiguchi T, Kracht M, Kitajima I, Maruyama I (2003) ASK1-p38 MAPK/JNK signaling cascade mediates anandamide-induced PC12 cell death. J Neurochem 85:50-61.

Sarnyai Z, Shaham Y, Heinrichs SC (2001) The role of corticotropin-releasing factor in drug addiction. Pharmacol Rev 53:209-243.

Sarnyai Z, Hohn J, Szabo G, Penke B (1992) Critical role of endogenous corticotropin-releasing factor (CRF) in the mediation of the behavioral action of cocaine in rats. Life Sci 51:2019-2024.

Sarnyai Z, Dhabhar FS, McEwen BS, Kreek MJ (1998) Neuroendocrine-related effects of long-term, 'binge' cocaine administration: diminished individual differences in stress-induced corticosterone response. Neuroendocrinology 68:334-344.

Sarnyai Z, Biro E, Gardi J, Vecsernyes M, Julesz J, Telegdy G (1993) Alterations of corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in different brain regions after acute cocaine administration in rats. Brain Res 616:315-319.

Sattler R, Tymianski M (2000) Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. J Mol Med (Berl) 78:3-13.

Schifano F, Corkery JM, Cuffolo G (2007) Smokable ("ice", "crystal meth") and non smokable amphetamine-type stimulants: clinical pharmacological and epidemiological issues, with special reference to the UK. Ann Ist Super Sanita 43:110-115.

Schlicker E, Kathmann M (2001) Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. Trends Pharmacol Sci 22:565-572.

Schmidt CJ, Sonsalla PK, Hanson GR, Peat MA, Gibb JW (1985) Methamphetamine-induced depression of monoamine synthesis in the rat: development of tolerance. J Neurochem 44:852-855.

Schnabel J (2009) Neuroscience: Rethinking rehab. Nature 458:25-27.

Schwarz H, Blanco FJ, Lotz M (1994) Anadamide, an endogenous cannabinoid receptor agonist inhibits lymphocyte proliferation and induces apoptosis. J Neuroimmunol 55:107-115.

Scott JC, Woods SP, Matt GE, Meyer RA, Heaton RK, Atkinson JH, Grant I (2007) Neurocognitive effects of methamphetamine: a critical review and meta-analysis. Neuropsychol Rev 17:275-297.

Seiden LS, Sabol KE, Ricaurte GA (1993) Amphetamine: effects on catecholamine systems and behavior. Annu Rev Pharmacol Toxicol 33:639-677.

Sekine Y, Iyo M, Ouchi Y, Matsunaga T, Tsukada H, Okada H, Yoshikawa E, Futatsubashi M, Takei N, Mori N (2001) Methamphetamine-related psychiatric symptoms and reduced brain dopamine transporters studied with PET. Am J Psychiatry 158:1206-1214.

Sekine Y, Minabe Y, Ouchi Y, Takei N, Iyo M, Nakamura K, Suzuki K, Tsukada H, Okada H, Yoshikawa E, Futatsubashi M, Mori N (2003) Association of dopamine transporter loss in the orbitofrontal and dorsolateral prefrontal cortices with methamphetamine-related psychiatric symptoms. Am J Psychiatry 160:1699-1701.

Sekine Y, Ouchi Y, Sugihara G, Takei N, Yoshikawa E, Nakamura K, Iwata Y, Tsuchiya KJ, Suda S, Suzuki K, Kawai M, Takebayashi K, Yamamoto S, Matsuzaki H, Ueki T, Mori N, Gold MS, Cadet JL (2008) Methamphetamine causes microglial activation in the brains of human abusers. J Neurosci 28:5756-5761.

Self DW, Genova LM, Hope BT, Barnhart WJ, Spencer JJ, Nestler EJ (1998) Involvement of cAMP-dependent protein kinase in the nucleus accumbens in cocaine self-administration and relapse of cocaine-seeking behavior. J Neurosci 18:1848-1859.

Setlow B (2008) Undoing cocaine's consequences on behavior and brain. Proc Natl Acad Sci U S A 105:16829-16830.

Shaham Y, Stewart J (1995) Stress reinstates heroin-seeking in drug-free animals: an effect mimicking heroin, not withdrawal. Psychopharmacology (Berl) 119:334-341.

Shaham Y, Erb S, Leung S, Buczek Y, Stewart J (1998) CP-154,526, a selective, non-peptide antagonist of the corticotropin-releasing factor1 receptor attenuates stress-induced relapse to drug seeking in cocaine- and heroin-trained rats. Psychopharmacology (Berl) 137:184-190.

Shaham Y, Funk D, Erb S, Brown TJ, Walker CD, Stewart J (1997) Corticotropin-releasing factor, but not corticosterone, is involved in stress-induced relapse to heroin-seeking in rats. J Neurosci 17:2605-2614.

Shen M, Thayer SA (1998) Cannabinoid receptor agonists protect cultured rat hippocampal neurons from excitotoxicity. Mol Pharmacol 54:459-462.

Sheng P, Ladenheim B, Moran TH, Wang XB, Cadet JL (1996) Methamphetamine-induced neurotoxicity is associated with increased striatal AP-1 DNA-binding activity in mice. Brain Res Mol Brain Res 42:171-174.

Shepard JD, Bossert JM, Liu SY, Shaham Y (2004) The anxiogenic drug yohimbine reinstates methamphetamine seeking in a rat model of drug relapse. Biol Psychiatry 55:1082-1089.

Simon SL, Domier C, Carnell J, Brethen P, Rawson R, Ling W (2000) Cognitive impairment in individuals currently using methamphetamine. Am J Addict 9:222-231.

Sinha R (2001) How does stress increase risk of drug abuse and relapse? Psychopharmacology (Berl) 158:343-359.

Sinha R, Li CS (2007) Imaging stress- and cue-induced drug and alcohol craving: association with relapse and clinical implications. Drug Alcohol Rev 26:25-31.

Sinha R, Catapano D, O'Malley S (1999) Stress-induced craving and stress response in cocaine dependent individuals. Psychopharmacology (Berl) 142:343-351.

Smith JA, Mo Q, Guo H, Kunko PM, Robinson SE (1995) Cocaine increases extraneuronal levels of aspartate and glutamate in the nucleus accumbens. Brain Res 683:264-269.

Smith SR, Terminelli C, Denhardt G (2000) Effects of cannabinoid receptor agonist and antagonist ligands on production of inflammatory cytokines and anti-inflammatory interleukin-10 in endotoxemic mice. J Pharmacol Exp Ther 293:136-150.

Solinas M, Goldberg SR, Piomelli D (2008) The endocannabinoid system in brain reward processes. Br J Pharmacol 154:369-383.

Solinas M, Goldberg SR, Piomelli D (2008b) The endocannabinoid system in brain reward processes. Br J Pharmacol 154:369-383.

Solinas M, Justinova Z, Goldberg SR, Tanda G (2006) Anandamide administration alone and after inhibition of fatty acid amide hydrolase (FAAH) increases dopamine levels in the nucleus accumbens shell in rats. J Neurochem 98:408-419.

Solinas M, Thiriet N, Chauvet C, Jaber M (2010) Prevention and treatment of drug addiction by environmental enrichment. Prog Neurobiol 92:572-592.

Solinas M, Thiriet N, El Rawas R, Lardeux V, Jaber M (2009) Environmental enrichment during early stages of life reduces the behavioral, neurochemical, and molecular effects of cocaine. Neuropsychopharmacology 34:1102-1111.

Solinas M, Panlilio LV, Tanda G, Makriyannis A, Matthews SA, Goldberg SR (2005) Cannabinoid agonists but not inhibitors of endogenous cannabinoid transport or metabolism enhance the reinforcing efficacy of heroin in rats. Neuropsychopharmacology 30:2046-2057.

Solinas M, Tanda G, Justinova Z, Wertheim CE, Yasar S, Piomelli D, Vadivel SK, Makriyannis A, Goldberg SR (2007) The endogenous cannabinoid anandamide produces delta-9-tetrahydrocannabinol-like discriminative and neurochemical effects that are enhanced by inhibition of fatty acid amide hydrolase but not by inhibition of anandamide transport. J Pharmacol Exp Ther 321:370-380.

Sonsalla PK, Nicklas WJ, Heikkila RE (1989) Role for excitatory amino acids in methamphetamine-induced nigrostriatal dopaminergic toxicity. Science 243:398-400.

Soria G, Mendizabal V, Tourino C, Robledo P, Ledent C, Parmentier M, Maldonado R, Valverde O (2005) Lack of CB1 cannabinoid receptor impairs cocaine self-administration. Neuropsychopharmacology 30:1670-1680.

Sotiropoulos I, Catania C, Riedemann T, Fry JP, Breen KC, Michaelidis TM, Almeida OF (2008) Glucocorticoids trigger Alzheimer disease-like pathobiochemistry in rat neuronal cells expressing human tau. J Neurochem 107:385-397.

Sotiropoulos I, Catania C, Pinto LG, Silva R, Pollerberg GE, Takashima A, Sousa N, Almeida OF (2011) Stress acts cumulatively to precipitate Alzheimer's disease-like tau pathology and cognitive deficits. J Neurosci 31:7840-7847.

Sriram K, Miller DB, O'Callaghan JP (2006a) Minocycline attenuates microglial activation but fails to mitigate striatal dopaminergic neurotoxicity: role of tumor necrosis factor-alpha. J Neurochem 96:706-718.

Sriram K, Matheson JM, Benkovic SA, Miller DB, Luster MI, O'Callaghan JP (2006b) Deficiency of TNF receptors suppresses microglial activation and alters the susceptibility of brain regions to MPTP-induced neurotoxicity: role of TNF-alpha. Faseb J 20:670-682.

Stairs DJ, Bardo MT (2009) Neurobehavioral effects of environmental enrichment and drug abuse vulnerability. Pharmacol Biochem Behav 92:377-382.

Steiner MA, Wotjak CT (2008) Role of the endocannabinoid system in regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. Prog Brain Res 170:397-432.

Steiner MA, Wanisch K, Monory K, Marsicano G, Borroni E, Bachli H, Holsboer F, Lutz B, Wotjak CT (2008) Impaired cannabinoid receptor type 1 signaling interferes with stress-coping behavior in mice. Pharmacogenomics J 8:196-208.

Stella N, Schweitzer P, Piomelli D (1997) A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. Nature 388:773-778.

Stephans SE, Whittingham TS, Douglas AJ, Lust WD, Yamamoto BK (1998) Substrates of energy metabolism attenuate methamphetamine-induced neurotoxicity in striatum. J Neurochem 71:613-621.

Sulzer D, Chen TK, Lau YY, Kristensen H, Rayport S, Ewing A (1995) Amphetamine redistributes dopamine from synaptic vesicles to the cytosol and promotes reverse transport. J Neurosci 15:4102-4108.

Sunanda, Rao BS, Raju TR (2000) Restraint stress-induced alterations in the levels of biogenic amines, amino acids, and AChE activity in the hippocampus. Neurochem Res 25:1547-1552.

T

Takahashi T, Momiyama A (1993) Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. Nature 366:156-158.

Tanda G, Goldberg SR (2003) Cannabinoids: reward, dependence, and underlying neurochemical mechanisms--a review of recent preclinical data. Psychopharmacology (Berl) 169:115-134.

Tanda G, Pontieri FE, Di Chiara G (1997) Cannabinoid and heroin activation of mesolimbic dopamine transmission by a common mu1 opioid receptor mechanism. Science 276:2048-2050.

Tanda G, Munzar P, Goldberg SR (2000) Self-administration behavior is maintained by the psychoactive ingredient of marijuana in squirrel monkeys. Nat Neurosci 3:1073-1074.

Tang YP, Wang H, Feng R, Kyin M, Tsien JZ (2001) Differential effects of enrichment on learning and memory function in NR2B transgenic mice. Neuropharmacology 41:779-790.

Tata DA, Yamamoto BK (2007) Interactions between methamphetamine and environmental stress: role of oxidative stress, glutamate and mitochondrial dysfunction. Addiction 102 Suppl 1:49-60.

Tata DA, Raudensky J, Yamamoto BK (2007) Augmentation of methamphetamine-induced toxicity in the rat striatum by unpredictable stress: contribution of enhanced hyperthermia. Eur J Neurosci 26:739-748.

Terwilliger RZ, Beitner-Johnson D, Sevarino KA, Crain SM, Nestler EJ (1991) A general role for adaptations in G-proteins and the cyclic AMP system in mediating the chronic actions of morphine and cocaine on neuronal function. Brain Res 548:100-110.

Thiemann G, van der Stelt M, Petrosino S, Molleman A, Di Marzo V, Hasenohrl RU (2008) The role of the CB1 cannabinoid receptor and its endogenous ligands, anandamide and 2-arachidonoylglycerol, in amphetamine-induced behavioural sensitization. Behav Brain Res 187:289-296.

Thiriet N, Deng X, Solinas M, Ladenheim B, Curtis W, Goldberg SR, Palmiter RD, Cadet JL (2005) Neuropeptide Y protects against methamphetamine-induced neuronal apoptosis in the mouse striatum. J Neurosci 25:5273-5279.

Thiriet N, Gennequin B, Lardeux V, Chauvet C, Decressac M, Janet T, Jaber M, Solinas M (2011) Environmental enrichment does not reduce the rewarding and neurotoxic effects of methamphetamine. Neurotox Res 19:172-182.

Thiriet N, Amar L, Toussay X, Lardeux V, Ladenheim B, Becker KG, Cadet JL, Solinas M, Jaber M (2008) Environmental enrichment during adolescence regulates gene expression in the striatum of mice. Brain Res 1222:31-41.

Thomas DM, Kuhn DM (2005) MK-801 and dextromethorphan block microglial activation and protect against methamphetamine-induced neurotoxicity. Brain Res 1050:190-198.

Thomas DM, Francescutti-Verbeem DM, Kuhn DM (2008) The newly synthesized pool of dopamine determines the severity of methamphetamine-induced neurotoxicity. J Neurochem 105:605-616.

Thome J, Sakai N, Shin K, Steffen C, Zhang YJ, Impey S, Storm D, Duman RS (2000) cAMP response element-mediated gene transcription is upregulated by chronic antidepressant treatment. J Neurosci 20:4030-4036.

Thompson PM, Hayashi KM, Simon SL, Geaga JA, Hong MS, Sui Y, Lee JY, Toga AW, Ling W, London ED (2004) Structural abnormalities in the brains of human subjects who use methamphetamine. J Neurosci 24:6028-6036.

Thrash B, Thiruchelvan K, Ahuja M, Suppiramaniam V, Dhanasekaran M (2009) Methamphetamine-induced neurotoxicity: the road to Parkinson's disease. Pharmacol Rep 61:966-977.

Tillerson JL, Caudle WM, Reveron ME, Miller GW (2003) Exercise induces behavioral recovery and attenuates neurochemical deficits in rodent models of Parkinson's disease. Neuroscience 119:899-911.

Torasdotter M, Metsis M, Henriksson BG, Winblad B, Mohammed AH (1996) Expression of neurotrophin-3 mRNA in the rat visual cortex and hippocampus is influenced by environmental conditions. Neurosci Lett 218:107-110.

Torasdotter M, Metsis M, Henriksson BG, Winblad B, Mohammed AH (1998) Environmental enrichment results in higher levels of nerve growth factor mRNA in the rat visual cortex and hippocampus. Behav Brain Res 93:83-90.

Torres E, Gutierrez-Lopez MD, Mayado A, Rubio A, O'Shea E, Colado MI (2011) Changes in interleukin-1 signal modulators induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA): regulation by CB2 receptors and implications for neurotoxicity. J Neuroinflammation 8:53.

Torres E, Gutierrez-Lopez MD, Borcel E, Peraile I, Mayado A, O'Shea E, Colado MI (2010) Evidence that MDMA ('ecstasy') increases cannabinoid CB2 receptor expression in microglial cells: role in the neuroinflammatory response in rat brain. J Neurochem 113:67-78.

Tourino C, Zimmer A, Valverde O (2010) THC Prevents MDMA Neurotoxicity in Mice. PLoS One 5:e9143.

Tsou K, Brown S, SaÃ±udo-PeÃ±a MC, Mackie K, Walker JM (1998) Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. Neuroscience 83:393-411.

Turner AM, Greenough WT (1985) Differential rearing effects on rat visual cortex synapses. I. Synaptic and neuronal density and synapses per neuron. Brain Res 329:195-203.

Twitchell W, Brown S, Mackie K (1997) Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons. J Neurophysiol 78:43-50.

U

Ueda N, Kurahashi Y, Yamamoto S, Tokunaga T (1995) Partial purification and characterization of the porcine brain enzyme hydrolyzing and synthesizing anandamide. J Biol Chem 270:23823-23827.

Uriguen L, Perez-Rial S, Ledent C, Palomo T, Manzanares J (2004) Impaired action of anxiolytic drugs in mice deficient in cannabinoid CB1 receptors. Neuropharmacology 46:966-973.

V

Valjent E, Maldonado R (2000b) A behavioural model to reveal place preference to delta 9-tetrahydrocannabinol in mice. Psychopharmacology (Berl) 147:436-438.

Valjent E, Mitchell JM, Besson MJ, Caboche J, Maldonado R (2002) Behavioural and biochemical evidence for interactions between Delta 9-tetrahydrocannabinol and nicotine. Br J Pharmacol 135:564-578.

Valjent E, Pages C, Herve D, Girault JA, Caboche J (2004) Addictive and non-addictive drugs induce distinct and specific patterns of ERK activation in mouse brain. Eur J Neurosci 19:1826-1836.

Valjent E, Corvol JC, Trzaskos JM, Girault JA, Herve D (2006) Role of the ERK pathway in psychostimulant-induced locomotor sensitization. BMC Neurosci 7:20.

Valjent E, Pascoli V, Svenningsson P, Paul S, Enslen H, Corvol JC, Stipanovich A, Caboche J, Lombroso PJ, Nairn AC, Greengard P, Herve D, Girault JA (2005) Regulation of a protein phosphatase cascade allows convergent dopamine and glutamate signals to activate ERK in the striatum. Proc Natl Acad Sci U S A 102:491-496.

van der Stelt M, Mazzola C, Esposito G, Matias I, Petrosino S, De Filippis D, Micale V, Steardo L, Drago F, Iuvone T, Di Marzo V (2006) Endocannabinoids and beta-amyloid-induced neurotoxicity in vivo: effect of pharmacological elevation of endocannabinoid levels. Cell Mol Life Sci 63:1410-1424.

van Praag H, Kempermann G, Gage FH (2000) Neural consequences of environmental enrichment. Nat Rev Neurosci 1:191-198.

Van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, Mouihate A, Urbani P, Mackie K, Stella N, Makriyannis A, Piomelli D, Davison JS, Marnett LJ, Di Marzo V, Pittman QJ, Patel KD, Sharkey KA (2005) Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. Science 310:329-332.

Vanderschuren LJ, Kalivas PW (2000) Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. Psychopharmacology (Berl) 151:99-120.

Venero C, Borrell J (1999) Rapid glucocorticoid effects on excitatory amino acid levels in the hippocampus: a microdialysis study in freely moving rats. Eur J Neurosci 11:2465-2473.

Vigano D, Valenti M, Cascio MG, Di Marzo V, Parolaro D, Rubino T (2004) Changes in endocannabinoid levels in a rat model of behavioural sensitization to morphine. Eur J Neurosci 20:1849-1857.

Vigano D, Grazia Cascio M, Rubino T, Fezza F, Vaccani A, Di Marzo V, Parolaro D (2003) Chronic morphine modulates the contents of the endocannabinoid, 2-arachidonoyl glycerol, in rat brain. Neuropsychopharmacology 28:1160-1167.

Vinklerova J, Novakova J, Sulcova A (2002) Inhibition of methamphetamine self-administration in rats by cannabinoid receptor antagonist AM 251. J Psychopharmacol 16:139-143.

Volkmar FR, Greenough WT (1972) Rearing complexity affects branching of dendrites in the visual cortex of the rat. Science 176:1445-1447.

Volkow ND, Chang L, Wang GJ, Fowler JS, Franceschi D, Sedler M, Gatley SJ, Miller E, Hitzemann R, Ding YS, Logan J (2001a-a) Loss of dopamine transporters in methamphetamine abusers recovers with protracted abstinence. J Neurosci 21:9414-9418.

Volkow ND, Chang L, Wang GJ, Fowler JS, Ding YS, Sedler M, Logan J, Franceschi D, Gatley J, Hitzemann R, Gifford A, Wong C, Pappas N (2001a-b) Low level of brain dopamine D2 receptors in methamphetamine abusers: association with metabolism in the orbitofrontal cortex. Am J Psychiatry 158:2015-2021.

Volkow ND, Chang L, Wang GJ, Fowler JS, Leonido-Yee M, Franceschi D, Sedler MJ, Gatley SJ, Hitzemann R, Ding YS, Logan J, Wong C, Miller EN (2001b) Association of dopamine transporter reduction with psychomotor impairment in methamphetamine abusers. Am J Psychiatry 158:377-382.

Volkow ND, Chang L, Wang GJ, Fowler JS, Leonido-Yee M, Franceschi D, Sedler MJ, Gatley SJ, Hitzemann R, Ding YS, Logan J, Wong C, Miller EN (2001c) Association of dopamine transporter reduction with psychomotor impairment in methamphetamine abusers. Am J Psychiatry 158:377-382.

W

Wagner GC, Ricaurte GA, Seiden LS, Schuster CR, Miller RJ, Westley J (1980) Long-lasting depletions of striatal dopamine and loss of dopamine uptake sites following repeated administration of methamphetamine. Brain Res 181:151-160.

Walter L, Franklin A, Witting A, Wade C, Xie Y, Kunos G, Mackie K, Stella N (2003) Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. J Neurosci 23:1398-1405.

Walters CL, Blendy JA (2001) Different requirements for cAMP response element binding protein in positive and negative reinforcing properties of drugs of abuse. J Neurosci 21:9438-9444.

West RW, Greenough WT (1972) Effect of environmental complexity on cortical synapses of rats: preliminary results. Behav Biol 7:279-284.

White NM (1996) Addictive drugs as reinforcers: multiple partial actions on memory systems. Addiction 91:921-949; discussion 951-965.

Wills TA, Vaccaro D, McNamara G, Hirky AE (1996) Escalated substance use: a longitudinal grouping analysis from early to middle adolescence. J Abnorm Psychol 105:166-180.

Wilson JM, Kalasinsky KS, Levey AI, Bergeron C, Reiber G, Anthony RM, Schmunk GA, Shannak K, Haycock JW, Kish SJ (1996) Striatal dopamine nerve terminal markers in human, chronic methamphetamine users. Nat Med 2:699-703.

Wilson RI, Nicoll RA (2001) Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. Nature 410:588-592.

Woolverton WL, Ricaurte GA, Forno LS, Seiden LS (1989) Long-term effects of chronic methamphetamine administration in rhesus monkeys. Brain Res 486:73-78.

X

Xi ZX, Gilbert JG, Peng XQ, Pak AC, Li X, Gardner EL (2006) Cannabinoid CB1 receptor antagonist AM251 inhibits cocaine-primed relapse in rats: role of glutamate in the nucleus accumbens. J Neurosci 26:8531-8536.

Xi ZX, Peng XQ, Li X, Song R, Zhang HY, Liu QR, Yang HJ, Bi GH, Li J, Gardner EL (2011) Brain cannabinoid CB(2) receptors modulate cocaine's actions in mice. Nat Neurosci 14:1160-1166.

Xu Z, Hou B, Gao Y, He F, Zhang C (2007) Effects of enriched environment on morphine-induced reward in mice. Exp Neurol 204:714-719.

Y

Young D, Lawlor PA, Leone P, Dragunow M, During MJ (1999) Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. Nat Med 5:448-453.

Young ST, Porrino LJ, Iadarola MJ (1991) Cocaine induces striatal c-fos-immunoreactive proteins via dopaminergic D1 receptors. Proc Natl Acad Sci U S A 88:1291-1295.

Yuan M, Kiertscher SM, Cheng Q, Zoumalan R, Tashkin DP, Roth MD (2002) Delta 9-Tetrahydrocannabinol regulates Th1/Th2 cytokine balance in activated human T cells. J Neuroimmunol 133:124-131.

Yuan ZY, Gu P, Liu L, Wang YY, Liu J, Cui DS, Geng Y, Zhang ZX, Zhu AP, Ma L, Wang MW (2009) Neuroprotective effects of enriched environment in MPTP-treated SAMP8 mice. Neurosci Lett 454:6-10.

Z

Zafar KS, Siegel D, Ross D (2006) A potential role for cyclized quinones derived from dopamine, DOPA, and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid in proteasomal inhibition. Mol Pharmacol 70:1079-1086.

Zhang L, Kitaichi K, Fujimoto Y, Nakayama H, Shimizu E, Iyo M, Hashimoto K (2006) Protective effects of minocycline on behavioral changes and neurotoxicity in mice after administration of methamphetamine. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 30:1381-1393.

Zhu J, Green T, Bardo MT, Dwoskin LP (2004) Environmental enrichment enhances sensitization to GBR 12935-induced activity and decreases dopamine transporter function in the medial prefrontal cortex. Behav Brain Res 148:107-117.

Zhu J, Apparsundaram S, Bardo MT, Dwoskin LP (2005) Environmental enrichment decreases cell surface expression of the dopamine transporter in rat medial prefrontal cortex. J Neurochem 93:1434-1443.

Zhu JP, Xu W, Angulo N, Angulo JA (2006b) Methamphetamine-induced striatal apoptosis in the mouse brain: comparison of a binge to an acute bolus drug administration. Neurotoxicology 27:131-136.