La comorbidité entre dépendance aux opiacés et dépression : mécanismes sérotoninergiques dans un modèle murin

Pierre-Eric Lutz

▶ **To cite this version:**

Pierre-Eric Lutz. La comorbidité entre dépendance aux opiacés et dépression : mécanismes sérotoninergiques dans un modèle murin. Neurobiologie. Université de Strasbourg, 2012. Français. NNT : 2012STRAJ022 . tel-00856593

HAL Id: tel-00856593
https://theses.hal.science/tel-00856593

Submitted on 2 Sep 2013

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

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

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE ED414

IGBMC UMR 7104

THÈSE présentée par :

Pierre-Eric LUTZ

soutenue le : **3 septembre 2012**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Neurosciences

La comorbidité entre dépendance aux opiacés et dépression: mécanismes sérotoninergiques dans un modèle murin

THÈSE dirigée par :
Mme KIEFFER Brigitte Pr, université de Strasbourg

RAPPORTEURS :
Mme BELZUNG Catherine Pr, université François-Rabelais, Tours
Mme MANSUY Isabelle Pr, Neuroscience Center, Zurich

AUTRES MEMBRES DU JURY :
Mr BARROT Michel Dr, université de Strasbourg

Je dédie ce travail à ma famille:

Isa et Paul,

mes parents,

Servane et Martin,

Robin,

Seb et Loulou.

Remerciements

Je remercie le Professeur Brigitte Kieffer, qui m'a accueilli dans son laboratoire il y a plus de 4 ans. Je vous remercie pour la liberté, la confiance et le soutien que vous m'avez apportés. Je suis sûr que nous continuerons à débattre de « la prochaine manip' ».

Je remercie les Professeurs Catherine Belzung et Isabelle Mansuy pour avoir accepté de juger mon travail et pour leur présence aujourd'hui.

Je remercie le Docteur Michel Barrot, pour sa disponibilité et son soutien tout au long de ma thèse et pour ses (trop) nombreuses lettres de recommandation.

Je remercie les Professeurs Jean-Marie Danion et Gilles Bertschy pour leur présence dans ce jury et leur regard de clinicien sur mon travail.

Je remercie chacun des membres de notre équipe, anciens et petits nouveaux, trop nombreux pour être énumérés ici.

Je remercie enfin l'ensemble des membres de l'institut, des plateformes technologiques, des services techniques et administratifs, pour leur efficacité et leur disponibilité qui font de cet institut un formidable environnement de recherche.

SOMMAIRE

Liste des figures 5
Liste des abréviations 7

Présentation 9

Introduction 11

Chapitre I. La dépendance aux opiacés 11
1. Sémiologie 12
2. Epidémiologie 14
3. Traitement 15

Chapitre II. La dépression 21
1. Sémiologie 22
2. Epidémiologie 24
3. Traitement 25

Chapitre III. La comorbidité entre dépression et dépendance aux opiacés 29
1. La notion de comorbidité en psychiatrie 30
2. Sémiologie 32
3. Epidémiologie 33
4. Traitement 37
a) Traitement de substitution aux opiacés (TSO) 37
b) Traitement antidépresseur 39

Chapitre IV. Physiopathologie de la comorbidité entre dépression et dépendance aux opiacés 41
1. Le système opioïde, acteur majeur de la comorbidité ? 42
a) Récepteurs et ligands du système opioïde 42
b) Métabolisme, pharmacocinétique et pharmacodynamie des opiacés d'abus 49
2. Physiopathologie de la dépendance aux opiacés 52
a) Modèles animaux de dépendance aux opiacés 52
b) Théories de l'addiction 54
3. Physiopathologie de la dépression 58
a) Modèles animaux de dépression 58
b) Embryogénèse du système sérotoninergique 59
c) Sérotonine, traitement antidépresseur et neurogènèse hippocampique 61
d) Biosynthèse et métabolisme de la sérotonine 62
e) Le récepteur à la sérotonine 5-HT1A 64
4. Le stress, facteur de risque de comorbidité 65

5. Le cerveau social 66
6. L'abstinence aux opiacés chez le rongeur 67
Article 1. Opioid receptors: distinct roles in mood disorders 71

Résultats expérimentaux 105

Chapitre V. Modélisation de l'abstinence à la morphine chez la souris 105
Article 2. Impaired emotional-like behavior and serotonergic function during protracted abstinence from chronic morphine. 107
Article 3. Sequential and opposing alterations of 5-HT_{1A} receptor function during withdrawal from chronic morphine 127
Article 4. Chronic morphine treatment in adolescent mice increases despair-like behaviour but promotes sociability into adulthood in a strain-dependant manner 135

Chapitre VI. Modélisation de l'abstinence à l'héroïne chez la souris 159
Expérience 1. L'abstinence à l'héroïne chez la souris : cinétique comportementale 161
a) Matériels et méthodes 161
b) Résultats 165
c) Discussion 177
Expérience 2. Traitement antidépresseur chronique au cours de l'abstinence à l'héroïne 184
a) Matériels et méthodes 184
b) Résultats 186
c) Discussion 188
Expérience 3. Rôle du récepteur opioïde kappa dans l'abstinence à l'héroïne 190
a) Matériels et méthodes 190
b) Résultats 192
c) Discussion 194
Expérience 4. Rôle du récepteur opioïde delta dans l'abstinence à l'héroïne 196
a) Matériels et méthodes 196
b) Résultats 198
c) Discussion 201
Expérience 5. Rôle du récepteur opioïde mu dans l'abstinence à l'héroïne : approche de knockout conditionnel 203
a) Matériels et méthodes 203
b) Résultats 206
c) Discussion 208

Expérience 6. Modification à l'échelle du génome de l'expression des ARN messagers et des micro-ARN dans le noyau du raphé dorsal au cours de l'abstinence à l'héroïne et du traitement antidépresseur chronique 211
a) Matériels et méthodes 212
b) Résultats 216
c) Discussion 222

Discussion générale 225

Conclusion 229

Annexes 231
Annexe 1. Révision proposée pour le DSM-V (en anglais) de la définition du « trouble d'usage de substance » (substance-use disorder) 232
Annexe 2. Questionnaire de l'ASI (addiction severity index), version française 233
Annexe 3. Définition de la dépression selon la classification internationale des maladies (CIM-10, F32 épisode dépressif) 246
Annexe 4. Médicaments antidépresseurs commercialisés en France dans le traitement des épisodes dépressifs. 247
Annexe 5 (Article 5). Cholecystokinin knock-down in the basolateral amygdala has anxiolytic and antidepressant-like effects in mice 248
Annexe 6. Séquences nucléotidiques des micro-ARN (miR) matures présumés identifiés par l'algorithme miRDeep2 dans le noyau du raphé dorsal, pour les groupes (A) et (B) de miR présentés dans le tableau 2 260

Bibliographie 261

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Nombre de pathologies psychiatriques diagnostiquées tout au long de la vie, en pourcentage de la population générale 31

Figure 2. La comorbidité entre dépendance aux substances psychoactives et dépression 34

Figure 3. Nombre de comorbidités psychiatriques chez les sujets dépendants de substances psychoactives 35

Figure 4. Courbes de survie (maintien en traitement) de patients suivant un traitement de substitution par méthadone ou par buprénorphine, en présence ou non d'un diagnostic de dépression 38

Figure 5. Le système opioïde 42

Figure 6. Homologie de séquence protéique des 3 récepteurs opioïdes murins 43

Figure 7. Les peptides opioïdes endogènes 45

Figure 8. Distribution des récepteurs et peptides opioïdes dans le cerveau (rat et souris) 47

Figure 9. Métabolisme de l'héroïne et de la morphine 50

Figure 10. Voie dopaminergique mésocorticolimbique chez la souris 55

Figure 11. Dépression et voie mésolimbique 56

Figure 12. Embryogénèse du système sérotoninergique 60

Figure 13. Biosynthèse et métabolisme de la sérotonine 63

Figure 14. Effets de l'injection systémique de morphine (10 mg/kg, voie sous-cutanée) sur les taux extracellulaires de sérotonine dans le cerveau antérieur chez le rat 69

Figure 15. Evolution du poids des souris au cours du traitement héroïne et de l'abstinence 165

Figure 16. Mesure d'un comportement de type anxieux dans le test du champ ouvert au cours de l'abstinence à l'héroïne. 167

Figure 17. Mesure des effets de l'abstinence à l'héroïne sur les interactions sociales 169

Figure 18. Mesure d'un comportement de type dépressif dans le test de la suspension caudale au cours de l'abstinence à l'héroïne 171

Figure 19. Mesure d'un comportement de type dépressif dans le test de la nage forcée au cours de l'abstinence à l'héroïne. 172

Figure 20. Mesure de la mémoire de travail spatiale dans le test de labyrinthe en Y au cours de l'abstinence à l'héroïne. 174

Figure 21. Mesure de la préférence pour le sucrose au cours de l'abstinence à l'héroïne. 176

Figure 22. Mesure des effets d'un traitement antidépresseur pendant l'abstinence à l'héroïne sur les interactions sociales. 186

Figure 23. Mesure de la mémoire spatiale dans le test du labyrinthe en Y suite à un traitement antidépresseur au cours de l'abstinence à l'héroïne. 188

Figure 24. Mesure des effets de la délétion génétique du récepteur kappa sur les interactions sociales lors de l'abstinence à l'héroïne. 192

Figure 25. Mesure des effets de la délétion génétique du récepteur kappa sur la préférence pour le sucrose lors de l'abstinence à l'héroïne 193

Figure 26. Mesure des effets de la délétion génétique du récepteur delta sur les interactions sociales lors de l'abstinence à l'héroïne. 198

Figure 27. Mesure des effets de la délétion génétique du récepteur delta sur la préférence pour le sucrose lors de l'abstinence à l'héroïne. 200

Figure 28. Injection de virus recombinants AAV_2 par chirurgie stéréotaxique dand le noyau du raphé dorsal (DRN) 206

Figure 29. Knockout conditionnel du récepteur mu obtenu spécifiquement dans le noyau du raphé dorsal par injection d'un vecteur viral AAV_2-Cre chez des souris mu « floxées » 207

Figure 30. Schéma de l'expérience 6. Etude des modifications de l'expression des ARN messagers et des micro-ARNs dans le noyau du raphé dorsal après 4 semaines d'abstinence à l'héroïne et suite au traitement antidépresseur chronique par la fluoxétine 213

Figure 31. Diagramme de Venn: analyse transcriptionnelle par hybridation sur puces Affymetrix, illustrant le nombre d'ARN messagers (transcrits) dont l'expression est modifiée par l'abstinence à l'héroïne, par le traitement antidépresseur ou suivant une interaction entre ces 2 facteurs 216

Figure 32. Représentation des 15 micro-ARN les plus exprimés dans le noyau du raphé dorsal chez des souris naïves adultes de souche C57BL/6J. 218

Tableau 1. Comparaison des 15 micro-ARN les plus exprimés dans 3 régions du cerveau chez la souris adulte de souche C57BL/6J: le noyau du raphé dorsal, le cortex frontal et l'hippocampe. 219

Tableau 2. Identification par l'algorithme miRDeep2 de nouveaux micro-ARN présumés dans le noyau du raphé dorsal. 221

LISTE DES ABREVIATIONS

Aadc, amino-acid decarboxylase

ACTH, adrénocorticotrophine

AFSSAPS, agence française de sécurité sanitaire des produits de santé

AMPc, adénosine monophosphate cyclique

ANAES, agence nationale d'accréditation et d'évaluation en santé

ANOVA, analyse de la variance

APC, aversion de place conditionnée

ADN, acide désoxyribonucléique

ADNc, ADN complémentaire

ARN, acide ribonucléique

ARNm, ARN messager

ATP, adénosine triphosphate

BDNF, *brain derived neurotrophic factor*

cKO, knockout conditionnel

CIDI, *Composite International Diagnostic Interview*

CIM, classification internationale des maladies

CPF, cortex pré-frontal

CREB, *cAMP responsive element*

CRH, c*orticotropin-releasing hormone*

CREMEAS, comité régional d'éthique en matière d'expérimentation animale

CSD, *chronic social defeat*

CSST, centre de soins spécialisés aux toxicomanes

CSAPA, centre de soins, d'accompagnement et de prévention en addictologie

DA, dopamine

dHIPP, hippocampe dorsal

DIS, *diagnostic interview schedule*

DPCPX, 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine

DSM-III, *diagnostic and statistical manual of mental disorders*, 3ème version

DSM-IIIR, *diagnostic and statistical manual of mental disorders*, 3ème version révisée

DSM-IV, *diagnostic and statistical manual of mental disorders*, 4ème version

DTT, dithiothreitol

DRN, noyau du raphé dorsal

ECA, *Epidemiology Catchment Area*

ECT, électroconvulsivothérapie

EDM, episode dépressif majeur

EDTA, acide éthylène diamine tétra acétique

eGFP, *enhanced green fluorecent protein*

ESEMeD, *european study of epidemiology of mental disorders*

FLX, fluoxétine

GABA, acide γ-aminobutyrique

GDP, guanosine diphosphate

GTP, guanosine triphosphate

HHS, axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien

HPLC, chromatographie en phase liquide à haute performance

IMAO, inhibiteurs de la monoamine oxydase

INPES, institut national de prévention et d'éducation pour la santé

IV, intra-veineuse

i.p., intra-péritonéal

IRSN, inhibiteurs de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline

ISRS, inhibiteurs spécifiques de la recapture de la sérotonine

KD, knockdown

KO, *knockout*

miR, micro-ARN

M3G, morphine-3-glucoronide

M6G, morphine-6-glucoronide

NA, noradrénaline

NAc, noyau accumbens

NCS, *national comorbidity survey*

NCS-R, *national comorbidity survey, replication study*

NESARC, *national epidemiology survey on alcohol and related conditions*

nor-BNI, norbinaltorphimine

NRM, noyau du raphé médian

OR, odd-ratio

PAG, substance grise périaqueducale

PDYN, prodynorphine

PENK, proenkephaline

POMC, proopiomélanocortine

PPC, préférence de place conditionnée

PKA, protéine kinase dépendante de l'AMPc

PKC, protéine kinase C

qPCR, *Polymerase Chain Reaction* quantitative

RCPG, récepteur couplé aux protéines G

RPM, rotations par minute

s.c., sous-cutanée

SCLI, stress chronique léger et imprévisible

SCL-90, *symptom check-list 90*

Sert, *serotonin reuptake transporter*

SSC, stress social chronique

THC, delta-9-tétrahydrocannabinol

TSO, traitement de substitution aux opiacés

TO, turnover

Tph2, isoforme 2 de la tryptophan hydroxylase

UGT, UDP-glucuronosyltransférase

WT, wild-type

5-HIAA, acide-5-hydroxyindolacétique

5-HT, sérotonine

5-HT_{1A}R, récepteur à la sérotonine 5-HT_{1A}

6-MAM, 6-monoacétyl-morphine

8-OH-DPAT, (R)-(+)-8-Hydroxy-2-dipropylamino-tetralin hydrobromide

PRESENTATION

L'addiction ou dépendance aux substances psychoactives est une affection chronique, émaillée de rechutes, caractérisée principalement par des comportements compulsifs de recherche et de consommation de drogue (Koob and Volkow, 2010). Il s'agit d'une pathologie grave et fréquente (toutes drogues confondues, environ 4% de la population générale, voir (Grant et al., 2004a)). Les sujets qui parviennent à se désengager de ces compulsions sont considérés comme abstinents. Les études épidémiologiques montrent que l'abstinence, notamment pour les opiacés, est fortement associée à une prévalence accrue de la dépression (Grella et al., 2009). La dépression représente, tout comme l'addiction, un défi pour les systèmes de soins modernes, touchant environ 10 à 15% de la population générale (Grant et al., 2004b).

Le but de mon travail de thèse était d'aborder spécifiquement la cooccurrence des troubles dépressifs et addictifs. J'ai participé à l'élaboration d'un modèle murin de cette comorbidité, et nous nous sommes focalisés sur l'addiction aux opiacés, en particulier la morphine et l'héroïne. La prise en charge de cette comorbidité mobilise un savoir transversal et une prise en charge somatique et psychique du patient. Les symptômes dépressifs constituent vraisemblablement un facteur de rechute important chez les patients dépendants d'une substance psychoactive, et il apparait crucial de traiter ces symptômes. Sur le plan théorique, l'étude de ce double diagnostic permet de jeter des ponts entre champs disciplinaires et suggère de nouvelles hypothèses expérimentales. Je présente ici une tentative de double approche, clinique et de recherche fondamentale, qui se veut le reflet d'un parcours personnel.

Dans une première partie (**Introduction**), nous résumerons les principaux aspects cliniques de la dépendance aux opiacés (**chapitre I**) et de la dépression (**chapitre II**). Puis nous décrirons la notion de comorbidité et montrerons que les données cliniques et épidémiologiques accumulées depuis une vingtaine d'années affirment l'importance de la comorbidité entre ces 2 pathologies (**chapitre III**). Enfin, nous rappellerons l'état actuel des connaissances sur les mécanismes physiopathologiques à l'œuvre dans chacune de ces maladies, en nous focalisant sur leurs points de convergence (**chapitre IV**).

Dans une deuxième partie (**Résultats Expérimentaux**), nous présenterons le modèle d'abstinence aux opiacés que nous avons développé chez la souris. Nous débuterons par l'abstinence à la morphine (sous forme d'articles scientifiques publiés ou soumis, voir **chapitre V**). Suite à un traitement morphinique chronique et au cours de l'abstinence apparaissent progressivement des comportements apparentés à la dépression. Ce traitement morphinique modifie profondément le fonctionnement du système sérotoninergique, et les déficits comportementaux observés peuvent être prévenus par un traitement antidépresseur ciblant ce système. Enfin nous présenterons notre travail sur l'abstinence à l'héroïne (données non publiées), qui permet de généraliser notre modèle d'abstinence et devrait renforcer notre compréhension des mécanismes impliquant le noyau du raphé dorsal, lieu principal d'innervation sérotoninergique, dans la comorbidité entre dépendance aux opiacés et dépression (**chapitre VI**).

INTRODUCTION

CHAPITRE I. LA DEPENDANCE AUX OPIACES

La dépendance ou addiction peut être définie comme un comportement d'utilisation pathologique de substances telles que les drogues, les médicaments et l'alcool (Reynaud, 2005). La dépendance pour une drogue d'abus est une pathologie chronique et récidivante qui se développe suite à des consommations répétées. Le concept d'addiction comprend tous les comportements de consommation, ce qui nécessite d'y inclure les notions d'usage et d'abus (Reynaud, 2005). Les pratiques addictives posent à notre société un problème majeur de santé publique, dont les conséquences humaines, sociétales et économiques sont particulièrement lourdes. Ces comportements sont fréquents et la sémiologie psychiatrique moderne reconnait également, outre l'addiction aux psychotropes, la notion d'addiction sans drogue (addictions au travail, au jeu, au sport, au sexe…). Le jeu pathologique devrait d'ailleurs faire son entrée dans les classifications internationales. Ces comportements perturbent des mécanismes neurobiologiques essentiels et le fonctionnement psychique : lorsque la dépendance s'est installée, les périodes d'abstinence alternent avec les périodes d'intoxications et tout au long de sa vie, le sujet présentera un risque de rechute. Enfin, les sujets abstinents présentent plus fréquemment des troubles psychiatriques que la population générale, comme nous le verrons dans le chapitre III de cette introduction.

De tout temps, l'homme a fait usage de substances psychotropes : notamment l'opium issu de la culture du pavot, est utilisé à des fins thérapeutiques et récréatives depuis plusieurs milliers d'années. Au 19ème siècle, l'isolement de son principe actif essentiel, la morphine, permet l'émergence progressive de toute la panoplie moderne des analgésiques de la famille des opiacés. Puis, l'héroïne est synthétisée en laboratoire et se révèle posséder des propriétés euphorisantes plus puissantes encore que celles de la morphine.

Le travail de thèse présenté ici s'est focalisé sur l'abstinence aux opiacés. Bien que les opiacés représentent une part relativement faible de l'ensemble des conduites addictives, de nouveaux modes de consommation se sont développés. En particulier, l'héroïne est de plus en plus fréquemment consommée par voie nasale ou fumée, faisant craindre une démocratisation de son usage (Frank, 2000), alors que les traitements antalgiques (comme l'Oxycontin®) sont détournés de leur fonction. En outre le système opioïde endogène, cible des opiacés, représente sur le plan neurobiologique une voie de convergence (Contet et al., 2004) des dépendances à la nicotine, à l'alcool, à la cocaine et au delta-9-tétrahydrocannabinol (THC, le principe actif du cannabis), toutes drogues pour lesquelles une comorbidité avec la dépression est décrite. Dans ce contexte, l'étude de ce système est à même selon nous d'éclairer des mécanismes communs à ces différentes drogues.

1. Sémiologie

L'addiction est un processus complexe d'installation progressive. Le DSM IV définit ainsi 3 types d'utilisation de substances psychoactives : l'usage, l'abus et la dépendance. Afin d'harmoniser les pratiques, de diagnostiquer de façon rigoureuse et reproductible les pathologies mentales, des classifications internationales ont été élaborées, dont les 2 plus utilisées sont:

- le manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux (DSM, 4ème version révisée ou DSM IV-TR, classification de l'association américaine de psychiatrie),
- la classification internationale des maladies (CIM, 10ème version ou CIM-10 ; classification européenne).

L'ensemble des définitions présentées sont tirées de l'ouvrage Psychiatrie de l'enfant, de l'adolescent et de l'adulte (abrégés MASSON, 2003) ou directement du DSM IV (American Psychiatric Association, 1994). L'**usage** est défini comme une consommation qui n'entraine ni complication somatique ni dommage psychique.

L'**abus** est défini selon le DSM-IV par 2 critères :

A. Mode d'utilisation inadéquat d'une substance conduisant à une altération du fonctionnement ou à une souffrance cliniquement significative, caractérisée par la présence d'au moins une des manifestations suivantes au cours d'une période de 12 mois :
    1. Utilisation répétée d'une substance conduisant à l'incapacité de remplir des obligations majeures, au travail, à l'école ou à la maison (par exemple, absences répétées ou mauvaises performances au travail du fait de l'utilisation de la substance, absences, exclusions temporaires ou définitives de l'école, négligence des enfants ou des tâches ménagères),
    2. Utilisation répétée d'une substance dans des situations ou cela peut être physiquement dangereux (par exemple, lors de la conduite d'une voiture ou en faisant fonctionner une machine alors que l'on est sous l'influence d'une substance),
    3. Problèmes judiciaires répétés liés à l'utilisation d'une substance (par exemple, arrestations pour comportement anormal en rapport avec l'utilisation de la substance),
    4. Utilisation de la substance malgré des problèmes interpersonnels ou sociaux, persistants ou récurrents, causés ou exacerbés par les effets de la substance (par exemple, disputes avec le conjoint à propos des conséquences de l'intoxication, bagarres).

B. Les symptômes n'ont jamais atteint, pour cette classe de substance, les critères de la dépendance.

La **dépendance** est un mode d'utilisation inapproprié d'une substance, entrainant une détresse ou un dysfonctionnement cliniquement significatif, comme en témoignent trois (ou plus) des manifestations suivantes, survenant à n'importe quel moment sur la même période de 12 mois :

1. Existence d'une tolérance, définie par l'une ou l'autre des manifestations suivantes : besoin de quantités nettement majorées de la substance pour obtenir une intoxication ou l'effet désiré ; effet nettement diminué en cas d'usage continu de la même quantité de substance,
2. Existence d'un syndrome de sevrage, comme en témoigne l'une ou l'autre des manifestations suivantes : syndrome de sevrage caractéristique de la substance ; la même substance (ou une substance apparentée) est prise dans le but de soulager ou d'éviter les symptômes de sevrage,
3. La substance est souvent prise en quantité supérieure ou sur un laps de temps plus long que prévu,
4. Un désir persistant ou des efforts infructueux sont faits pour réduire ou contrôler l'utilisation de la substance,
5. Un temps considérable est passé à faire le nécessaire pour se procurer la substance, la consommer ou récupérer de ses effets,
6. D'importantes activités sociales, occupationnelles ou de loisirs sont abandonnées ou réduites en raison de l'utilisation de la substance,
7. L'utilisation de la substance est poursuivie malgré l'existence d'un problème physique ou psychologique persistant ou récurrent déterminé ou exacerbé par la substance.

Il est intéressant de signaler que cette distinction entre abus et dépendance inscrite dans le DSM-IV est actuellement critiquée (American Psychiatric Association - DSM-V development, 2010) à l'occasion des travaux d'élaboration du DSM-V et ce pour plusieurs raisons :

- le diagnostic d'abus serait peu reproductible en comparaison avec celui de dépendance (Hasin and Beseler, 2009),
- l'abus était considéré comme le prodrome de la dépendance, une considération réfutée par plusieurs études prospectives (Grant et al., 2001; Schuckit et al., 2001; Schuckit et al., 2008),
- l'existence de patients « orphelins » d'un diagnostic, c'est-à-dire ne remplissant ni les critères de l'abus, ni ceux de la dépendance (Lynskey and Agrawal, 2007; Martin et al., 2008; Pollock and Martin, 1999).

Le DSM-V (voir l'annexe 1), devrait ainsi tenir compte de ces critiques en fusionnant l'abus et la dépendance en une seule entité, le *substance-use disorder (*qui pose d'ailleurs un problème de traduction: « trouble de l'usage d'une substance » ?). Soulignons que cette nouvelle définition minimise l'importance des critères de tolérance et de sevrage et les repousse respectivement en 4ème et 5ème positions. Par ailleurs, elle introduit le *craving,* défini comme un fort désir pour la substance : cette notion absente du DSM-IV est maintenant documentée par des travaux d'imagerie chez l'homme montrant une augmentation du débit sanguin cérébral et de la libération de dopamine dans certaines

structures cérébrales en réponse à la présentation d'« indices » (*cues* en anglais) associés à la substance (Childress et al., 1999; Volkow et al., 2006). Ces travaux chez l'homme font échos à des données similaires chez l'animal.

A partir de ces définitions communes aux différentes drogues d'abus, il convient de souligner que chaque produit présente ses propres particularités : effets aigus lors de la prise (par exemple, la nicotine présente des propriétés euphorisantes faibles par rapport à la morphine), voies d'administration, durées et doses des prises de la phase d'usage avant l'apparition de l'usage abusif, comorbidités somatiques, etc…

Les usagers d'opiacés présentent une surmortalité importante. Les causes somatiques « naturelles » de cette surmortalité, liées à la pratique d'injections intraveineuses, sont bien identifiées et correspondent essentiellement à des causes infectieuses (hépatites virales, endocardite, sida) et aux overdoses. Mais cette surmortalité s'explique également par un risque de décès par suicide 14 fois plus élevé que dans la population générale (Darke and Ross, 2002), avec une utilisation plus fréquente de médicaments lors des tentatives de suicide (mais rarement d'opiacés).

2. Epidémiologie

On considère aujourd'hui que 13 à 22 millions de personnes dans le monde consomment des opiacés (United nations office on drugs and crime, 2010). Le premier « marché » de consommateurs d'héroïne est l'Europe de l'Ouest, avec 26% de la consommation mondiale.

Aux Etats-Unis, selon l'étude « National Epidemiologic survey on alcohol and related conditions » (NESARC), l'abus d'opiacés, quel que soit le mode de consommation, touche 0,24% de la population (prévalence au cours des 12 derniers mois), contre 0,11% pour la dépendance aux opiacés (Grant et al., 2004b). A titre de comparaison, la prévalence de la dépendance toutes drogues confondues dans cette étude était de 4,1%. En Europe, la prévalence de l'usage de drogue par voie intraveineuse est estimée à 0.25% de la population, majoritairement des hommes (European monitoring centre for drugs and drug addiction, 2010). Selon la mission interministérielle de lutte contre les drogues et la toxicomanie (Observatoire français des drogues et des toxicomanies, 2010), on comptait en 2005 en France métropolitaine, parmi les 12-75 ans (chiffres issus d'enquêtes en population générale, par exemple lors de la journée d'appel et de préparation à la défense):

- 360.000 expérimentateurs (personnes ayant consommé au moins une fois le produit) pour l'héroïne,
- 900.000 expérimentateurs pour l'ecstasy, 1,1 millions pour la cocaïne, 12,4 millions pour le cannabis, contre 42,5 et 34,8 millions pour l'alcool et le tabac, respectivement.

Evidemment, tous les expérimentateurs ne développent pas une dépendance aux opiacés. Ainsi, l'observatoire français des drogues et des toxicomanies estime qu'en 2006, 230.000 personnes en France sont des usagers problématiques de drogue (usage de drogues par voie intraveineuse ou usage régulier, c'est-à-dire au moins 10 fois au cours d'un mois, d'opiacés, cocaïne ou amphétamines durant l'année passée pour le groupe d'âges de 15-64 ans), dont environ 120.000 suivent un

traitement de substitution aux opiacés, soit environ 0,18% de la population générale (Observatoire français des drogues et des toxicomanies). La diversité des données présentées ici souligne la difficulté d'évaluer le poids de ces conduites. Ainsi, la faible prévalence de l'usage d'opiacés (comme d'ailleurs pour la cocaïne ou les amphétamines) limite fortement l'apport des enquêtes en population générale à l'estimation du nombre d'usagers réguliers. Par comparaison, l'usage problématique est estimé à partir de calculs statistiques se basant sur plusieurs sources de données issues des centres de soins, d'accompagnement et de prévention en addictologie (CSAPA), du fichier national des auteurs d'infraction à la législation sur les stupéfiants, etc…

Ainsi, le poids des opiacés dans l'ensemble des conduites addictives est relativement modeste. Néanmoins étant donné les connaissances actuelles sur leur physiopathologie (voir le chapitre IV), la dépendance aux opiacés reste un bon modèle de l'ensemble des troubles addictifs. Et la dépendance aux opiacés entraine par rapport à d'autres substances comme la nicotine ou le cannabis, une morbidité médicale et psychosociale particulièrement lourde.

3. Traitement

La prise en charge de la dépendance aux opiacés doit bien sûr s'insérer dans une démarche pluridisciplinaire (Haute autorité de santé, 2004) faisant intervenir idéalement dans une structure unique (centre de soins, d'accompagnement et de prévention en addictologie, CSAPA) psychologues, psychiatres, médecins, infirmiers, travailleurs sociaux, etc… Elle consiste essentiellement à prévenir les risques (voie d'administration, matériel jetable) et à limiter les dommages associés, notamment infectieux (VIH, hépatites A et C). Elle utilise principalement deux traitements de substitution aux opiacés (TSO), la buprénorphine et la méthadone dont l'utilisation s'est essentiellement développée depuis 1995.

Dans la perspective de recherche fondamentale de ce travail, nous nous focaliserons sur les mécanismes et les effets des TSO. Les opiacés produisent leur effet euphorisant en activant le récepteur opioïde mu, fortement exprimés dans les circuits cérébraux de la récompense (voir chapitre IV). Les opiacés constituent une vaste classe de composés exogènes définis par leur aptitude commune à activer (propriété agoniste) un ou plusieurs récepteurs opioïdes (Inturrisi, 2002), au nombre de 3 : mu, kappa et delta (Le Merrer et al., 2009). Notre laboratoire a montré que c'est le récepteur mu qui est responsable de la dépendance physique, des effets antalgiques et euphorisants de la morphine, un opiacé de référence (Matthes et al., 1996). Il existe de très nombreux opiacés, naturels ou de synthèse, qui peuvent avoir des profils de sélectivité différents pour chacun de ces 3 récepteurs (Trescot et al., 2008). Parmi ces composés, on considère que c'est l'héroïne, synthétisée artificiellement par diacétylation de la morphine, qui présente le potentiel de dépendance le plus important. En effet, sur le plan pharmacocinétique elle traverse très rapidement la barrière hémato-encéphalique (c'est une molécule lipophile), permettant d'atteindre des taux cérébraux plus importants, ce qui expliquerait son « effet flash » (voir chapitre IV).

A l'inverse, d'autres opiacés comme la buprénorphine ou la méthadone présentent en cas d'administration sublinguale ou *per os*, respectivement, une pharmacocinétique beaucoup plus lente. Ceci permet de prévenir avec une seule prise médicamenteuse par jour le syndrome de sevrage chez les sujets dépendants, sans induire d'effet euphorisant significatif, d'où leur utilisation dans les traitements de substitution (Haute autorité de santé, 2004). Ils agissent également en diminuant le craving (Fudala et al., 2003; Shi et al., 2007). Nous considérerons ici la buprénorphine et la méthadone, représentant respectivement 80 et 20% des prescriptions de TSO en France et correspondant à 2 agonistes à longue durée d'action du récepteur mu (Ferrari et al., 2004). Notons que cette prépondérance de la prescription de buprénorphine est une spécificité française. Dans le reste du monde, la méthadone est le TSO le plus ancien et le plus prescrit.

D'autres modalités thérapeutiques ont été proposées : la clonidine, un agoniste d'un récepteur de l'adrénaline, le récepteur α_2 ; la naltrexone, l'antagoniste spécifique et général des 3 récepteurs opioïdes (à demi-vie longue, par opposition à la naloxone, antagoniste à demi-vie courte, réservé au traitement des surdosages opiacés). Les études comparant la clonidine et la buprénorphine (Ling et al., 2005; Lintzeris et al., 2002; Marsch et al., 2005) ont montré la supériorité de la buprénorphine pour l'aide au sevrage d'opiacés illicites (voir aussi le chapitre IV). La naltrexone quant à elle semble moins efficace pour la substitution que les TSO, buprénorphine ou méthadone (Ahmadi and Ahmadi, 2003; Ahmadi et al., 2003). Récemment, certains auteurs ont suggéré l'utilisation d'implants sous-cutanés (assurant une libération prolongée pendant 15 jours) de Naltrexone, qui permettraient un gain thérapeutique considérable chez des patients dépendants de l'héroïne (Hulse et al., 2009) ou poly-toxicomanes (héroïne et amphétamine, par exemple (Tiihonen et al., 2012)). Un tel traitement par antagoniste bloquerait les effets objectifs et subjectifs des opiacés d'abus, même à très haute dose (500mg d'héroïne par voie intra-veineuse selon 2 cas cliniques, voir (Brewer, 2002)), un effet lié au blocage du récepteur mu. Il agirait également sur le craving, l'humeur et l'estime de soi (Gerra et al., 1995), et sur les processus de prise de décision (Boettiger et al., 2009). A notre connaissance, les mécanismes de ces effets et notamment les récepteurs opioïdes impliqués (Gelernter et al., 2007) sont étudiés surtout pour la dépendance à l'alcool (également traitée par la naltrexone) et restent très mal connus pour la dépendance aux opiacés. Une étude néerlandaise d'imagerie fonctionnelle est cependant sur les rails (http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01471145).

Ainsi la prise en charge de la dépendance aux opiacés consiste à l'heure actuelle à bloquer les effets potentiels des opiacés illicites, ou à les substituer, ce qui souligne en creux notre compréhension encore très lacunaire des processus neuropharmacologiques impliqués. Fondamentalement, les TSO ne sont pas destinés à rendre les patients abstinents. Ils permettent éventuellement de contrôler et de diminuer progressivement la dose des prises, afin de les rendre compatibles avec une vie sociale et sanitaire normale (Vocci et al., 2005):

- méthadone (Méthadone®) : la méthadone est un agoniste sélectif du récepteur mu. Elle est administrée *per os*, une fois par jour et sous forme d'une solution liquide (rendant impossible la voie IV) ou de gélule. La pharmacocinétique est variable d'un sujet à l'autre (contrairement à la buprénorphine) ce qui peut nécessiter des dosages plasmatiques. Elle

semble procurer une meilleure satisfaction que la buprénorphine avec notamment une moindre anxiété. En cas de comorbidité de ce type, il est admis de privilégier la méthadone.

- buprénorphine haut dosage (Subutex®) : il s'agit d'un agoniste partiel du récepteur mu et d'un antagoniste du récepteur kappa. Ce profil pharmacologique limite le risque de mort par surdose (Walsh et al., 1995), excepté lors d'interactions avec d'autres psychotropes. Il s'agit de comprimés administrés par voie sublinguale, une fois par jour.

Il existe actuellement un consensus pour juger l'impact de ces TSO clairement positif en termes de santé publique. Notamment, ils ont permis une réduction de la mortalité: elle est particulièrement nette quant au nombre de décès par surdose liés à l'héroïne, divisé par un facteur 4 à 5 entre 1994 et 2002 (Caplehorn et al., 1996; Gronbladh et al., 1990). La mortalité globale est également diminuée d'un facteur 4 à 6, selon les études (Gronbladh et al., 1990) On peut également énumérer comme bénéfices médicaux et sociaux:

- diminution drastique des infections par le VIH (Metzger et al., 1993),
- amélioration des issues de grossesse,
- effondrement des pratiques d'injection IV,
- meilleur accès au traitement de l'infection par le virus de l'hépatite C,
- taux de rétention dans le système de soins plus élevé.
- amélioration de l'insertion sociale des patients :

Néanmoins ces résultats doivent être nuancés en raison du caractère parcellaire des données disponibles et de la difficulté de mesurer la part des TSO dans les effets de la politique globale de réduction des risques menée depuis quelques années. Le dispositif actuel présente quelques défauts :

- le rapport de prescription méthadone/buprénorphine reste de 1 à 4, sans véritable choix pour le patient;
- certaines zones sont insuffisamment couvertes en termes de prescripteurs et de pharmaciens délivrant les TSO;
- certains départements sont dépourvus de centre de soins, d'accompagnement et de prévention en addictologie (CSAPA, correspondant aux anciens centres de soins spécialisés aux toxicomanes, CSST) alors que certains CSAPA ne délivrent pas de méthadone ;
- l'apparition d'un mésusage de la buprénorphine par injection IV, à l'origine de diverses complications;
- l'apparition de primodépendances aux TSO et d'un marché parallèle de TSO.

Un traitement par buprénorphine peut être initié par tout médecin ; la primo-prescription de méthadone est réservée aux CSAPA et aux praticiens hospitaliers avec relais possible par un médecin de ville. Dans la pratique, on constate que la part des médecins spécialistes (dont les

psychiatres) est minime dans l'ensemble des prescriptions de TSO en France (Reynaud, 2005). Ceci souligne le rôle central assumé par les médecins généralistes dans la gestion de ces patients. Enfin, en termes de comorbidités psychiatriques associées, l'impact de ces différences de profil pharmacologique est à l'heure actuelle très mal connu.

L'analyse de la littérature montre que la comparaison de l'efficacité des 2 TSO s'est focalisée essentiellement sur les taux de maintien en traitement et d'usage d'opiacés illicites. On peut considérer pour résumer que l'utilisation de doses plus fortes d'un TSO permet un maintien plus important des patients sous traitement. Ainsi par exemple, Fareed et collaborateurs (Fareed et al., 2009) ont comparé rétrospectivement 35 patients sous traitement méthadone à une dose comprise entre 60 et 100 mg/jour avec 25 patients prenant une dose supérieure à 100 mg/jour. Le dosage élevé permettait de diminuer la proportion de sujets continuant d'user d'opiacés illicites (et de cocaïne) et une amélioration significative (au contraire de l'autre groupe) d'un index de sévérité de la dépendance, l'ASI (pour addiction severity index, voir la version française en annexe 2). L'ASI est un entretien d'évaluation des comportements de dépendance. Il a été établit en 1980 (McLellan et al., 1980) aux Etats-Unis et importé en France en 1990 par une équipe bordelaise (Martin et al., 1996). Il permet une évaluation quantitative de la sévérité de la dépendance et se compose de 7 échelles, évaluées chacune par un score entre 0 et 1 : Drogue, Alcool, État médical, Relations familiales et sociales, État psychologique, Emploi et ressources, et Situation légale.

Par ailleurs, de nombreuses études comparant entre eux ces 2 traitements suggèrent que la méthadone permet une rétention des patients sous traitement plus importante que la buprénorphine, que l'on considère des doses fixes ou variables de chaque TSO (Connock et al., 2007; Ling et al., 1996; Mattick et al., 2003; Pinto et al., 2010). On peut faire l'hypothèse ici que la buprénorphine, étant un agoniste partiel comparé à la méthadone, ne permet pas de prévenir complètement le sevrage chez certains sujets dont la dépendance est très forte. Néanmoins, la buprénorphine pourrait être au contraire plus efficace pour diminuer l'usage d'opiacés illicites (Gerra et al., 2004; Giacomuzzi et al., 2003), même si toutes les études ne concordent pas sur ce point (Mattick et al., 2003; Mattick et al., 2008). Les patients dépendants aux opiacés considèreraient d'ailleurs eux-mêmes, selon certaines études, que la buprénorphine est plus à même de les aider à contrôler leur consommation d'héroïne (Pinto et al., 2010). L'activité antagoniste kappa de la buprénorphine pourrait être ici en cause : une importante littérature préclinique utilisant des modèles animaux (Chao and Nestler, 2004; Koob and Le Moal, 2008; Wee and Koob, 2010) démontre la potentialisation du tonus opioïde endogène ciblant le récepteur kappa lors de l'exposition chronique aux opiacés (notamment dans le striatum ventral, une structure participant à la régulation de l'humeur ; voir chapitre IV), mais aussi pour d'autres drogues d'abus (cocaïne, alcool par exemple). L'implication de ce récepteur dans les épisodes dépressifs majeurs (EDM) associés à l'abstinence aux opiacés est une hypothèse que nous avons testée dans notre modèle préclinique (voir Résultats Expérimentaux, chapitre VI). Ces données posent selon nous la question de l'utilisation d'antagonistes du récepteur kappa dans la prise en charge de l'usage de substances psychoactives, opiacé ou non. Montoya et collaborateurs ont par exemple étudié l'intérêt de la buprénorphine chez des patients dépendants aux opiacés et à la cocaïne (Montoya et al., 2004) ; leurs données suggèrent que l'effet thérapeutique de la buprénorphine sur la dépendance à la

cocaïne pourrait être indépendant de son effet sur la dépendance aux opiacés. Une autre étude a montré également que la buprénorphine pourrait être plus efficace que la méthadone pour contrôler la consommation de cocaïne chez les sujets sous TSO (Foltin and Fischman, 1996).

Ces 2 paramètres (rétention en traitement et usage d'opiacés illicites) ne sont pas en lien direct avec notre problématique de la comorbidité dépressive. De façon surprenante, les avantages respectifs de ces 2 TSO sont peu discutés dans cette perspective. Pourtant il est clair que le choix d'un TSO reste actuellement un sujet de débat, partiellement dicté en pratique par les habitudes des praticiens et des CSAPA, avec de grandes disparités en France et en comparaison avec d'autres pays. Etant donnée la force des données épidémiologiques démontrant cette comorbidité, il nous semble urgent de développer cette problématique. Dans le chapitre III et dans le cadre de notre sujet, nous nous focaliserons sur la comorbidité dépressive associée aux TSO et sur les éventuelles différences à cet égard entre méthadone et buprénorphine. Mais nous sommes bien sûr conscients que de nombreux autres aspects doivent intervenir dans le choix d'un TSO : morbidité somatique, qualité de vie ou insertion socio-économique des patients sous TSO, par exemple. L'agence nationale d'accréditation et d'évaluation en santé (ANAES) considère la méthadone comme "particulièrement indiquée en cas de dépendance sévère, de difficultés à renoncer à l'injection, de pathologie psychiatrique associée (notamment les troubles anxieux sévères) et de polyconsommations (alcool, benzodiazépines, cocaïne)". Néanmoins ces recommandations nous semblent peu documentées, et l'ANAES souligne elle-même "le faible nombre d'études permettant d'orienter le choix entre méthadone et buprénorphine" ((Haute autorité de santé, 2004), page 14).

INTRODUCTION

CHAPITRE II. LA DEPRESSION

La dépression est un trouble de l'humeur, qui marque une rupture avec l'état et le fonctionnement antérieur du sujet. Elle représente un problème sociétal majeur. De par sa fréquence, que nous avons déjà mentionnée. Ensuite de par son impact sur l'espérance de vie : 15% des personnes présentant un trouble dépressif décéderaient par suicide (Rihmer, 2007). Elle représente la première cause d'incapacité physique et psychique (Murray and Lopez, 1996) et un coût économique majeur, qui devrait encore s'alourdir dans les décennies à venir (Mathers and Loncar, 2006). Les antidépresseurs de référence ont été découverts il y a une soixantaine d'années : malgré des efforts de recherche importants, les nouvelles pistes thérapeutiques sont rares et la prise en charge des patients reste difficile dans certains cas. En outre, la dépression s'accompagne de comorbidités somatiques ou psychiatriques fréquentes, notamment des troubles addictifs, qui aggravent son pronostic. Comme pour la dépendance aux opiacés, nous allons résumer ici brièvement les principaux aspects cliniques de la dépression.

1. Sémiologie

La sémiologie d'un état dépressif est classiquement caractérisée par une triade symptomatique associant une humeur dépressive, un ralentissement psychomoteur et des signes somatiques associés. L'humeur dépressive est la caractéristique principale de la dépression (Goudemand, 2010). Il peut s'agir d'une douleur morale, d'une tristesse exagérée, d'une auto-dévalorisation, d'une vision pessimiste du monde ou de soi-même, qui peuvent s'accompagner de pleurs fréquents, d'un émoussement affectif voir d'une indifférence affective. Il peut également apparaître une diminution ou une perte de la capacité à éprouver du plaisir pour les activités habituelles de la vie quotidienne, ou anhédonie. Ce dernier aspect est pour nous particulièrement intéressant, puisqu'il fait l'objet d'une importante attention en recherche fondamentale sous la forme d'un modèle expérimental chez le rongeur (la préférence pour le sucrose), comme nous le verrons dans la deuxième partie de ce travail. Ces symptômes peuvent s'intensifier et entrainer une culpabilité, un sentiment constant et général de mal-être, un désespoir. A l'extrême, on retrouvera des idées mélancoliques d'incurabilité, d'indignité.

Le ralentissement psychomoteur, parfois discret initialement dans l'évolution de la maladie, affecte de façons variables différentes composantes motrices et cognitives. Le ralentissement moteur peut se traduire par une asthénie, un visage peu expressif (voir amimique), une bradykinésie, une voix monotone. Les troubles cognitifs sont constamment retrouvés dans la dépression. Ils sont souvent décrits comme fonctionnels et réversibles, même si des travaux récents remettent cette assertion en question (Bergouignan et al., 2008). On décrit entre autres : bradypsychie, aboulie, apragmatisme, troubles attentionnels et de la concentration. Les troubles mnésiques enfin, correspondent à des pertes de mémoire et une tendance à mémoriser préférentiellement les évènements négatifs sur le plan émotionnel (Leppanen, 2006). La dépression affecte les performances des patients à la fois dans des tâches de mémoire de rappel et dans des taches de reconnaissance, avec probablement un effet plus marqué sur la performance en rappel qu'en reconnaissance (Burt et al., 1995; Christensen et al., 1997; Kindermann and Brown, 1997). Elle affecte également la mémoire autobiographique (Van Vreeswijk and De Wilde, 2004; Williams et al., 2007) et les fonctions exécutives (Fossati et al., 2002). Il semble que le nombre de récurrences dépressives soit un bon élément prédictif de la sévérité des troubles cognitifs associés (Fossati et al., 2004a; Gorwood et al., 2008).

Ces troubles mnésiques et cognitifs sont particulièrement intéressants dans une approche clinique et neurobiologique. Les techniques de neuroimagerie fonctionnelle et structurale et les évaluations cognitives permettent de définir précisément les régions cérébrales impliquées dans la production et le maintien de ces symptômes, éclairant ainsi la physiopathologie de la dépression. Ainsi les données que nous avons énumérées, confortées par l'imagerie (Fossati et al., 2004b; Frodl et al., 2006), appuient l'hypothèse d'un déficit neurotrophique associé à la dépression et touchant l'hippocampe, une structure cérébrale jouant un rôle clé dans les processus cognitifs. Nous reviendrons sur ces troubles cognitifs dans le cadre de notre étude de l'abstinence à l'héroïne (chapitre VI).

Les signes somatiques peuvent correspondre à des plaintes douloureuses, fréquentes chez le patient dépressif et qui peuvent constituer le seul motif de consultation (Pearson et al., 1999). Rapidement, on décrit également des troubles de l'appétit (perte ou plus rarement prise de poids), des troubles du sommeil (sommeil non réparateur, insomnie d'endormissement, hypersomnie), une baisse de la libido, des troubles digestifs (ballonnement, diarrhées, constipation) et cardio-vasculaires (palpitations, bouffées de chaleur, hypotension).

S'agissant de la dépression, le DSM IV définit l'EDM de la façon suivante (voir en annexe 3 la définition de l'épisode dépressif selon la classification internationale des maladies, CIM-10 F32):

A. Au moins 5 des symptômes suivants doivent avoir été présents pendant une même période d'une durée de 2 semaines et avoir représenté un changement par rapport au fonctionnement antérieur ; au moins un des symptômes est soit (1) une humeur dépressive, soit (2) une perte d'intérêt ou de plaisir :
    1) Humeur dépressive présente pratiquement toute la journée, presque tous les jours, signalée par le sujet ou observée par les autres,
    2) Diminution marquée de l'intérêt ou du plaisir pour toutes ou presque toutes les activités pratiquement toute la journée, presque tous les jours (signalée par le sujet ou observée par les autres),
    3) Perte ou gain de poids significatif en l'absence de régime (par exemple, modification du poids corporel en 1 mois excédant 5%), ou diminution ou augmentation de l'appétit presque tous les jours,
    4) Insomnie ou hypersomnie presque tous les jours,
    5) Agitation ou ralentissement psychomoteur presque tous les jours (constaté par les autres, non limité à un sentiment subjectif de fébrilité ou de ralentissement intérieur),
    6) Fatigue ou perte d'énergie presque tous les jours,
    7) Sentiment de dévalorisation ou de culpabilité excessive ou inappropriée (qui peut être délirante), presque tous les jours (pas seulement se faire grief ou se sentir coupable d'être malade),
    8) Diminution de l'aptitude à penser ou à se concentrer ou indécision presque tous les jours (signalé par le sujet ou observé par les autres),
    9) Pensées de mort récurrentes (pas seulement une peur de mourir), idées suicidaires récurrentes sans plan précis ou tentative de suicide ou plan précis pour se suicider.

B. Les symptômes ne répondent pas aux critères d'épisode mixte (les critères sont réunis à la fois pour un épisode maniaque et pour un EDM, à l'exception du critère de durée) et cela presque tous les jours pendant au moins une semaine.

C. Les symptômes induisent une souffrance cliniquement significative ou une altération du fonctionnement social, professionnel ou dans d'autres domaines importants.

D. Les symptômes ne sont pas imputables aux effets physiologiques directs d'une substance (par exemple une substance donnant lieu à abus, un médicament) ou d'une affection médicale générale (par exemple une hypothyroïdie).

E. Les symptômes ne sont pas mieux expliqués par un deuil, c'est-à-dire après la mort d'un être cher, les symptômes persistent pendant plus de 2 mois ou s'accompagnent d'une altération marquée du fonctionnement, de préoccupations morbides, de dévalorisation, d'idées suicidaires, de symptômes psychotiques ou d'un ralentissement psychomoteur.

Cette définition introduit 2 critères majeurs, dont l'un au moins doit être présent pour établir le diagnsotic. Dans la perspective d'une modélisation chez l'animal, l'humeur dépressive est évidemment hors de propos et l'importance de la modélisation de l'anhédonie apparaît clairement (diminution marquée de l'intérêt ou du plaisir). Le critère D doit être précisé ici : les symptômes dépressifs sont considérés comme secondaires à la consommation d'une substance, notamment psycho-active, lorsqu'ils surviennent moins d'un moins après celle-ci.

Différentes formes cliniques de dépression sont classiquement décrites (Goudemand, 2010), que nous ne détaillerons pas ici : dépression mélancolique, dépression anxieuse, dépression délirante, dépression stuporeuse, dépression catatonique, dépression cognitive, dépression pseudo-démentielle, dépression atypique, dépression saisonnière.

Notons qu'il n'existe pas, à l'heure actuelle, d'examen complémentaire, biologique ou radiologique par exemple, considéré comme un critère diagnostique d'épisode dépressif.

L'épisode dépressif, même en l'absence de traitement, évolue favorablement : 53% de guérison à 1 an, 67% à 2 ans, 83% à 3 ans, 92% à 10 ans (Kessler et al., 1994; Mueller et al., 1996). Néanmoins, la dépression est une maladie chronique : 50% des patients présentent un nouvel épisode dans les 2 ans, 80% dans les 15 ans (Mueller et al., 1999). Lorsqu'un patient souffre d'EDM récurrents, il s'agit d'un trouble unipolaire. En cas d'alternance d'épisodes dépressifs et maniaques, on parle de trouble bipolaire.

Enfin, le suicide reste le risque majeur de la dépression non traitée. 15% des déprimés décèderaient par suicide (Rihmer, 2007) et un tiers des suicides surviennent chez des sujets dépressifs (abrégés MASSON, 2003).

2. Epidémiologie

La dépression est l'une des maladies les plus répandues dans le monde, avec plus de 100 millions de personnes atteintes chaque année, dont 3 millions en France. La dépression peut survenir à tout âge, du jeune enfant à la personne âgée (Achterberg et al., 2006; Costello et al., 2003). Les femmes souffrent d'EDM plus fréquemment que les hommes, d'un facteur 1,5 à 3 selon les études considérées (Bijl et al., 1998; Jenkins et al., 1997; Kessler et al., 2003; Lepine et al., 2005). Il s'agit d'un diagnostic extrêmement fréquent, comme l'ont montré de nombreuses études internationales et françaises, avec cependant des résultats chiffrés variables selon les critères des études considérées et les populations étudiées. Ainsi, une méta-analyse basée sur 17 études retrouve une prévalence au

cours des 12 derniers mois allant de 3 à 10%, avec une médiane à 7% environ (Wittchen and Jacobi, 2005). L'étude européenne ESEMeD (European study of epidemiology of mental disorders), réalisée entre 2001 et 2003, retrouvait une prévalence de l'EDM de 6 et 21,4% respectivement sur les 12 derniers mois ou au cours de la vie (Alonso and Lepine, 2007). L'institut national de prévention et d'éducation pour la santé (Inpes) a lancé en 2005 l'étude Anadep (Institut national de prévention et d'éducation pour la santé 2005), la plus vaste enquête par sondage en population générale sur le thème de la dépression en France. Selon cette étude, 5 et 17,8% des personnes interrogées ont présenté un EDM au cours des 12 derniers mois ou au cours de leur vie, respectivement. Ces données issues d'enquêtes en population générale sont critiquées car elles ne font pas intervenir le jugement d'un clinicien et utilisent souvent des méthodologies variables d'échantillonnage, de questionnaire, etc… Néanmoins elles donnent un ordre de grandeur et soulignent l'extrême fréquence de cette pathologie.

3. Traitement

La prise en charge de la dépression fait appel à de multiples modalités : psychothérapies dynamique, analytique ou cognitive, traitement médicamenteux, électroconvulsivothérapie (ECT), photothérapie (dépressions saisonnières) ; et à de nouvelles pistes thérapeutiques : stimulation magnétique transcrânienne, stimulation cérébrale profonde, médicaments ciblant des neurotransmetteurs non monoaminergiques (comme le glutamate, voir (Autry et al., 2011; Li et al., 2010)). L'ECT est réservée aux formes graves de dépression, pour lesquelles elle est plus efficace que les antidépresseurs (Vanelle et al., 2008). Par ailleurs, les troubles bipolaires font appel également aux thymo-régulateurs : carbonate de lithium, carbamazépine, divalproate de sodium.

La prise en charge de la dépression fait intervenir en première ligne psychiatres et médecins généralistes. Etant donné la fréquence de cette pathologie, il est primordial pour tout médecin généraliste de savoir dépister, diagnostiquer et orienter ces malades. La médecine générale tente également de codifier sa propre approche, encore balbutiante, de psychothérapie adaptée à une situation de soins singulière (Cape et al., 2000a; Cape et al., 2000b).

Bien que nous soyons conscients du caractère éminemment réducteur de cette approche, dans le cadre de notre travail orienté vers la modélisation animale de la comorbidité entre addiction et dépression, nous nous intéresserons plus particulièrement aux traitements médicamenteux. Ils ouvrent une perspective sur les mécanismes neurobiologiques en jeu et sont également très utilisés dans les modèles précliniques : à la fois comme instrument de validation de modèles de comportements apparentés à la dépression (on parle alors de validité prédictive) et pour approfondir la compréhension de leurs modes d'action. Enfin nous avons étudié dans notre modèle de comorbidité chez la souris les effets d'un traitement antidépresseur, la fluoxétine (FLX, voir chapitres V et VI). Nous ne détaillerons pas les mécanismes d'action, les indications ou les effets des autres modalités thérapeutiques non médicamenteuses : leur utilisation chez les patients présentant un diagnostic de

comorbidité (excepté la psychothérapie) est peu discutée à notre connaissance ; et la littérature préclinique dans les modèles de dépression est peu abondante les concernant.

Actuellement, les médicaments prescrits comme antidépresseur appartiennent à 5 grandes catégories définies par l'AFSSAPS (Agence francaise de sécurité sanitaire des produits de santé, 2006) : les imipraminiques (ou tricycliques), les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline (IRSN), les inhibiteurs spécifiques de la recapture de la sérotonine (ISRS), les inhibiteurs de la monoamine oxydase (IMAO) et une dernière classe d'« autres antidépresseurs » (voir l'annexe 4). Ces composés ont pour effet pharmacologique aigu d'augmenter les taux synaptiques de sérotonine (5-HT) ou de noradrénaline (NA).

Sur le plan de leur mode d'action (voir également le chapitre IV), on peut distinguer les antidépresseurs d'action monoaminergique non spécifique (IMAO, certains tricycliques, IRSN, miansérine, mirtazipine) et les antidépresseurs d'action monoaminergique spécifique (les ISRS). D'autres auteurs (Lôo et al., 2004) préconisent de distinguer les antidépresseurs selon leurs activités pré (recapture des monoamines) ou post-synaptique (antagonistes muscarinique, histaminergique H_1, adrénergique ou sérotoninergique). Les antidépresseurs non imipraminiques sont le plus souvent dépourvus d'activité anticholinergique, ce qui leur évite les contre-indications correspondantes (adénome prostatique, glaucome aigu à angle fermé).

Les antidépresseurs induisent notamment:

- la stimulation de l'humeur chez le sujet dépressif, qui s'oppose à l'absence d'effet euphorisant chez le sujet sain,
- un effet anxiolytique, dû aux propriétés sédatives de certains composés, liées à leur activité antihistaminique (amitryptiline, miansérine, par exemple) ou alpha-adrénolytique (amitryptyline, maprotiline entre autres). Il doit être distingué de l'effet des antidépresseurs dans les troubles anxieux caractérisés, qui apparaît en plusieurs semaines et n'est pas lié au caractère sédatif des molécules (Bauer et al., 2002),
- une stimulation psychomotrice, liée aux propriétés pro-dopaminergique ou anti-cholinergique des composés,
- un effet antalgique, notamment sur les douleurs neuropathiques,
- une action anti-obsessionnelle.

Les antidépresseurs sont indiqués en cas d'EDM d'intensité moyenne à modérée (Anderson et al., 2008). Les ISRS sont utilisés en première intention en raison d'une meilleure tolérance par rapport au traitement de deuxième ligne, à savoir les antidépresseurs tricycliques, dont le profil pharmacologique plus large contribue à induire plus fréquemment des effets indésirables. Ces derniers sont prévisibles selon les propriétés biochimiques des composés :

- effets anticholinergiques des imipraminiques : trouble de la vision, bouche sèche, constipation, tachycardie, rétention urinaire, confusion,
- effets sérotoninergiques : nausées, vomissements, diarrhée, hypersudation, céphalées, agitation, insomnie, somnolence, vertiges, tremblements et asthénie.

Par ailleurs, on décrit classiquement des effets secondaires :

- psychiques : recrudescence anxieuse, levée de l'inhibition psychomotrice et passage à l'acte suicidaire, virage maniaque de l'humeur, délire,
- neurologiques : manifestations épileptiques,
- cardio-vasculaires : hypotension, anomalies de l'électrocardiogramme, troubles du rythme.

En début de traitement peuvent se produire des recrudescences anxieuses qui pourraient correspondre à l'effet pharmacologique direct du composé sur la transmission monoaminergique. Au contraire, le traitement chronique induirait d'autres types d'adaptations moléculaires, fonctionnelles et structurales encore mal comprises (voir le chapitre IV), expliquant son efficacité retardée, souvent après plusieurs semaines de traitement. Le traitement doit être poursuivi 16 à 20 semaines (phase de consolidation) avant d'envisager un arrêt progressif (Agence francaise de sécurité sanitaire des produits de santé, 2006). Après 8 semaines de traitement, on retrouve classiquement un tiers de non répondeurs. L'absence de réponse à 4 semaines justifie un changement de stratégie thérapeutique. Lors d'un arrêt brutal du traitement, on observe un syndrome de sevrage dans 90% des cas, durant en général moins d'une semaine (Agence francaise de sécurité sanitaire des produits de santé, 2006). Des phénomènes de dépendance, bien que rares, ont été décrits, volontiers chez des sujets à risque (antécédent de trouble alimentaire, d'alcoolisme ou de toxicophilie).

Les antidépresseurs seraient à l'heure actuelle prescrits à mauvais escient : selon l'étude ESEMed (Alonso et al., 2004), seuls 28,5% des patients atteints d'EDM recevaient un antidépresseur avec une posologie et pour une durée en accord avec les recommandations, ce qui est un comble dans un pays gros consommateur de ces produits (65 millions de boites par an, en augmentation linéaire depuis au moins 15 ans ; (Observatoire National des Prescriptions et Consommations des Médicaments, 1998)).

INTRODUCTION

CHAPITRE III. LA COMORBIDITE ENTRE DEPENDANCE AUX OPIACES ET DEPRESSION

La comorbidité est un phénomène extrêmement courant en psychiatrie, qui toucherait la moitié des patients atteints d'une pathologie psychiatrique au cours de leur vie. Alors que notre compréhension des mécanismes neurobiologiques des pathologies psychiatriques, prises séparément, reste encore très limitée, il peut paraître hasardeux de s'intéresser particulièrement à ceux de ces mécanismes impliqués dans plusieurs pathologies. Au contraire, nous défendons l'idée que l'étude de la comorbidité en modèle préclinique devrait permettre de croiser les savoirs de différentes disciplines. Dans ce chapitre, nous définirons rapidement la notion de comorbidité, puis nous présenterons quelques unes des caractéristiques cliniques principales de l'association entre dépendance aux opiacés et dépression.

1. La notion de comorbidité en psychiatrie

La comorbidité est la présence, simultanée ou non, de 2 pathologies (ou plus) chez un même individu au cours d'une période donnée. En psychiatrie, la comorbidité est fréquente, comme l'ont démontré de nombreuses études (Cerda et al., 2008) et comme le constatent bien sûr tous les jours les cliniciens. Dans le cadre d'enquêtes épidémiologiques à grande échelle, des outils standardisés ont été développés pour permettre le diagnostic de toutes les affections psychiatriques par des interviewers non cliniciens. Le premier questionnaire standardisé, le Diagnostic Interview Schedule (DIS ; Robins et al., 1981), était basé sur les critères diagnostiques du DSM-III (American Psychiatric Association, 1980). En 1984 parait dans Archives of General Psychiatry (Boyd et al., 1984) un article pionnier sur la comorbidité psychiatrique, probablement l'un des premiers à avoir évalué sur une telle échelle (11519 personnes) la prévalence de différentes pathologies psychiatriques. Utilisant le DIS, cette étude a montré que la présence d'une pathologie accroît significativement le risque de développer toute autre pathologie du DSM III. Cette classification reconnaissait déjà certains liens entre pathologies, sous la forme de critères d'exclusion empêchant de faire simultanément 2 diagnostics particuliers. La comorbidité mesurée ici sur le plan épidémiologique excédait largement celle inscrite dans les critères d'exclusion du DSM III, révélant des interactions psychopathologiques encore non intégrées par la nosologie. Au début des années 80, l'étude américaine ECA (*Epidemiologic Catchment Area*) est réalisée sur une population d'environ 20000 personnes grâce au DIS également (Bourdon et al., 1992). Parmi les sujets de 18 ans ou plus remplissant les critères d'une affection psychiatrique, 35% présenteront 1 ou plus affection(s) supplémentaire(s) au cours de la vie. Puis au début des années 90, ce questionnaire DIS a été modifié pour s'adapter au DSM-IV et à la classification internationale des maladies (CIM) et donner ainsi naissance au « *Composite International Diagnostic Interview*» (CIDI, (Kessler and Ustun, 2004)). Les études NCS (*National Comorbidity Survey*, réalisée sur un échantillon de 8000 personnes) et NCS-R (*National Comorbidity Survey Replication*), utilisant le CIDI, montraient que 27% et 28% des sujets présentent 2 ou plus troubles psychiatriques tout au long de la vie, respectivement (figure 1 et (Kessler et al., 1994; Kessler et al., 2005)).

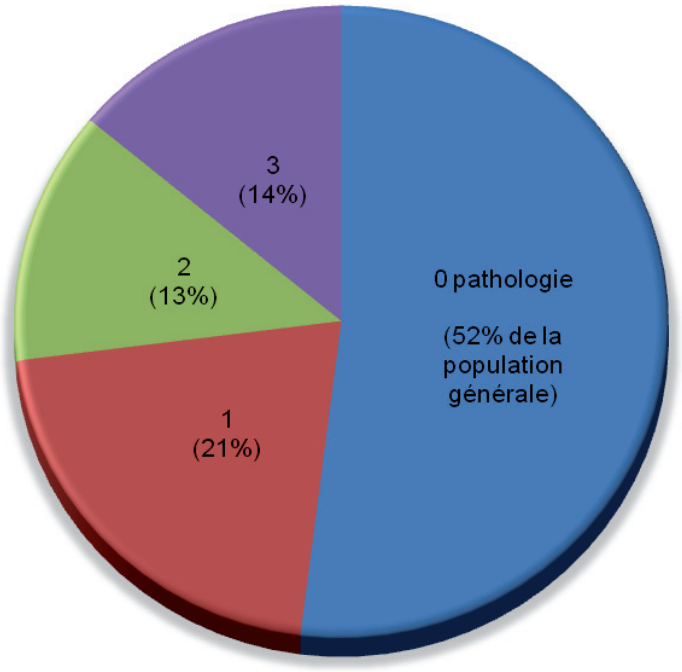


Figure 1. Nombre de pathologies psychiatriques diagnostiquées tout au long de la vie, en pourcentage de la population générale. Données issues de l'étude américaine *National Comorbidity Survey* (NCS) (Kessler et al., 2005).

L'étude de la comorbidité a d'importantes répercussions. Pour le clinicien, elle guide la recherche des pathologies associées et participe de l'évaluation du pronostic ; en effet, la comorbidité est associée à une symptomatologie psychiatrique plus sévère, une durée de maladie plus longue, une « compétence sociale » diminuée et des recours aux professionnels de santé plus fréquents (de Graaf et al., 2004; Renouf et al., 1997). Sur le plan neurobiologique, elle permet de poser de nouvelles hypothèses de travail sur l'implication de structures cérébrales ou de systèmes de neurotransmission communs à différentes pathologies psychiatriques, comme nous le verrons. Enfin, elle questionne l'approche nosologique catégorielle du DSM IV (dans laquelle chaque entité est définie en rupture avec la normalité) et a poussé certains auteurs à militer pour une approche dimensionnelle qui pourrait être mieux à même de rendre compte de la variabilité des tableaux cliniques. Par exemple, la notion de réactivité émotionnelle établit que le seuil d'intensité d'un stimulus (plaisant ou déplaisant) évoquant une réponse émotionnelle varie entre individus selon un continuum (Davidson, 1998). Ce concept utilisé dans l'approche des troubles bipolaires (Henry et al., 2008) s'avère pertinent dans la problématique de l'addiction (Klanecky and McChargue, 2009; Martin-Soelch et al., 2009).

2. Sémiologie

Il se pose tout d'abord la question fondamentale de la reconnaissance et de l'individualisation d'une de ces 2 pathologies chez les patients déjà diagnostiqués pour l'autre. Ainsi, qu'en est-il du trouble dépressif chez les patients déjà connus pour une dépendance aux opiacés ? Lors des tentatives de sevrage aux opiacés (illicites ou de substitution, d'ailleurs) et une fois les symptômes physiques dissipés, est classiquement décrit un syndrome d'abstinence, qui a fait parfois poser la question par certains auteurs d'une inscription dans la nosologie (Satel et al., 1993; Shi et al., 2007). Celui-ci inclut des symptômes anxieux, une modification de l'humeur, des insomnies, une irritabilité, de la frustration, une augmentation de l'appétit et/ou une prise de poids, ainsi que l'envie irrépressible de consommer le produit (*craving*). Nous recommandons la lecture de l'article de Grant et collaborateurs, dont l'introduction éclaire la distinction entre troubles dépressifs indépendant de la toxicomanie ou induits par celle-ci (Grant et al., 2004b). Ainsi, chez les patients présentant selon les critères du DSM-IV un abus ou une dépendance aux opiacés, le diagnostic de trouble de l'humeur indépendant peut être fait de 2 façons :

- soit le diagnostic de trouble de l'humeur est clairement établit avant le début des consommations d'opiacés,
- soit les symptômes persistent au-delà de 4 semaines après la fin des intoxications ou du sevrage physique.

La présence d'une comorbidité est évidemment un élément péjoratif pour le pronostic des patients concernés. Il est admis depuis des études assez anciennes que la survenue de tout trouble psychiatrique chez un patient dépendant des opiacés vient aggraver le pronostic et l'évolution de cette maladie (Kosten et al., 1986) et la dépression serait un facteur particulièrement aggravant en comparaison avec d'autres diagnostiques (Rounsaville et al., 1986). Ainsi, une méta-analyse puissante a montré que la dépression et le stress sont des facteurs prédictifs de poursuite des consommations d'opiacés illicites (Brewer et al., 1998). Les autres facteurs prédictifs retrouvés dans cette étude étaient : une consommation élevée d'opiacés avant le début du TSO, un antécédent de TSO, l'absence d'antécédent d'abstinence aux opiacés, une consommation d'alcool ancienne ou en cours, l'absence de travail, des difficultés professionnelles ou un traitement par TSO court. Par ailleurs, un affect dépressif pourrait directement aggraver le craving (Childress et al., 1994), facteur de rechute. De façon complémentaire, chez le patient dépressif l'apparition d'une conduite addictive est un facteur de risque de rechute et de résistance au traitement ((Goudemand, 2010); page 410). Enfin, en cas de double diagnostic, il existe une association statistique significative entre dépression et partage de seringues (Conner et al., 2008) ; et l'intensité de la symptomatologie dépressive est corrélée positivement avec la fréquence d'injection intraveineuse, participant ainsi au risque infectieux chez ces patients (Stein et al., 2003). L'ensemble de ces données souligne si besoin l'impérieuse nécessitée de systématiquement dépister les comorbidités, éléments majeurs du pronostic.

Se pose également la question des effets conjugués (additifs, multiplicatifs) de ces 2 pathologies sur la symptomatologie des patients. La question du suicide est ici particulièrement significative : comme nous l'avons déjà mentionné, ces 2 diagnostics sont individuellement associés à

un risque suicidaire important. Leur impact combiné est encore mal connu. De même, nous avons vu que la dépression, en particulier si elle s'accompagne d'idées suicidaires, s'associe à des troubles des fonctions cognitives. Quel est l'impact de la comorbidité sur ces fonctions, en particulier en cas d'idées suicidaires ?

3. Epidémiologie

La comorbidité entre dépendance aux substances psychoactives et troubles psychiatriques est apparue évidente dès les premières grandes séries épidémiologiques que nous avons déjà mentionnées. Ainsi, Regier et collaborateurs (Regier et al., 1990) ont analysé en détail les données de l'étude ECA, pour calculer le risque de comorbidité sous forme d' « odd-ratio » (OR, une mesure statistique proche du risque relatif). Ainsi chez les sujets présentant une pathologie psychiatrique quelle qu'elle soit, l'OR de présenter un trouble addictif comparé à la population générale était de 2,7. Parmi les sujets dépendants de l'alcool, 37% présentaient une comorbidité psychiatrique, ce chiffre montant même à 53% et un OR à 4,5 pour les autres substances d'abus, sans discerner entre les différentes drogues autres que l'alcool. Bien sûr, ces données doivent être relativisées aujourd'hui alors que les critères diagnostiques ont évolué. Les études suivantes ont confirmé cette comorbidité importante entre troubles émotionnels et addiction : l'étude *National comorbidity survey* (NCS), les études NCS-2 et NCS-Replication, prolongeant la précédente et intégrant la classification du DSM IV. Ces études ont analysé séparément la dépendance à l'alcool et les autres dépendances mais sans aller jusqu'à étudier toutes les comorbidités spécifiques possibles entre chaque pathologie psychiatrique et chaque dépendance, au contraire de l'étude américaine *National Epidemiologic Survey on Alcohol and related conditions* (NESARC).

L'étude NESARC (vague 1 ; (Grant et al., 2004b)), étude très puissante réalisée à partir de nombreuses interviews (43093 personnes représentatives de la population générale, âgées de 18 ans et plus), retrouve également des OR significatifs pour toutes les corrélations possibles entre dépendance et tout type de trouble dépressif (la distinction n'est faite initialement dans cette étude qu'entre l'alcool et toutes les autres drogues). Ces corrélations étaient significatives aussi bien pour l'abus que pour la dépendance, bien que plus fortes statistiquement pour la dépendance. Ceci montre que la transition d'un usage abusif à un état de dépendance induit une augmentation du risque de comorbidité psychiatrique. Il nous semble que cette donnée va à l'encontre de la nouvelle classification du DSM-V en cours d'élaboration et milite pour la pertinence d'une différenciation des types de consommation de substances psychoactives.

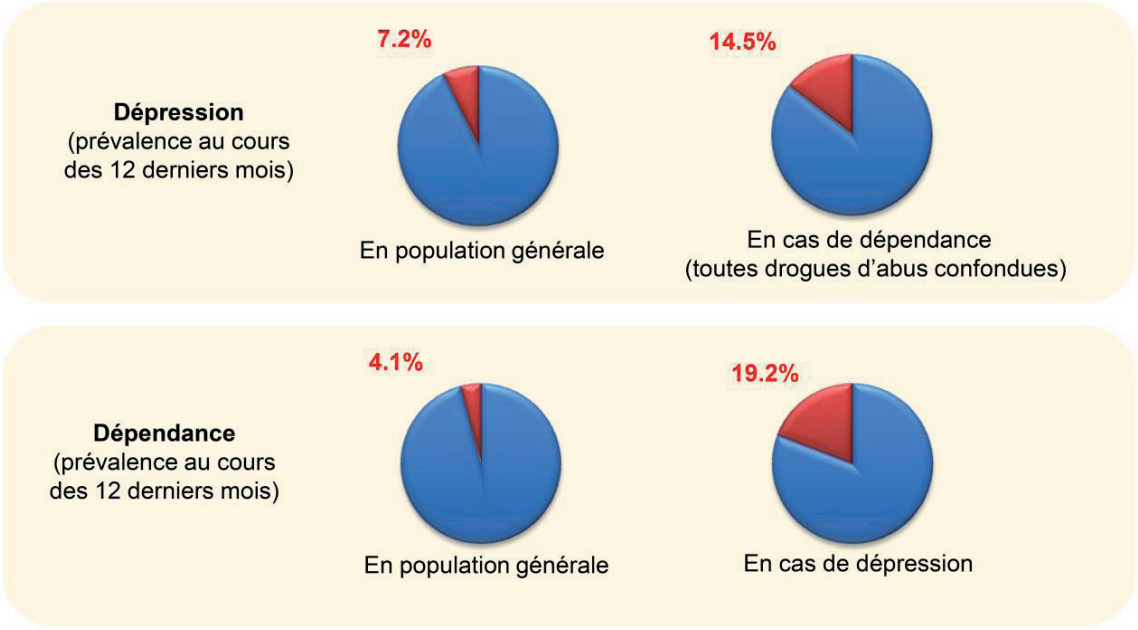


Figure 2. La comorbidité entre dépendance aux substances psychoactives et dépression (d'après (Grant et al., 2004b)). L'étude *National Epidemiologic Survey on Alcohol and related conditions* (NESARC) a retrouvé une prévalence de la dépression au cours des 12 derniers mois de 7,2% en population générale. Cette prévalence montait jusqu'à 14,5% dans le sous-groupe de répondants présentant un diagnostic de dépendance à une substance psychoactive.

La prévalence au cours des 12 derniers mois de l'EDM était dans cette étude de 7,2% en population générale, en accord avec les données françaises et européennes que nous déjà mentionnées. Parmi les personnes dépendantes à une substance, ce chiffre montait à 14,5% (figure 2), et même jusqu'à 44,3% si l'on considère les sujets en recherche d'une prise en charge pour un abus ou une dépendance d'une drogue autre que l'alcool. Cette dernière notion peut d'ailleurs être généralisée, puisque comme l'a montrée par la suite l'analyse des données NESARC, la comorbidité psychiatrique est plus importante chez les sujets dépendants en demande d'une prise en charge que dans la population générale des patients dépendants (figure 3). Ces données ont une importance considérable pour le clinicien et imposent, lors de l'affirmation d'un diagnostic et en particulier en cas de demande de prise en charge, la recherche de comorbidités associées. De façon complémentaire, la prévalence de la dépendance était de 19,2% chez les sujets souffrant d'EDM, contre 4.1% en population générale (toutes drogues confondues, sur les 12 derniers mois).

L'étude NESARC a été dès l'origine conçue pour différencier les troubles émotionnels induits par une dépendance à une drogue d'abus des troubles indépendants de toute addiction, en application stricte des critères du DSM IV (au contraire par exemple de l'étude NCS). Pour un individu dépendant d'une susbstance psychoactive, il est possible de diagnostiquer un trouble dépressif indépendant de 2 façons : soit cet épisode dépressif survient avant l'établissement de la dépendance, soit il persiste plus de 4 semaines au-delà après l'arrêt des intoxications ou du syndrome de sevrage. De façon spectaculaire, la prévalence des EDM indépendants était de 7,06% (contre 7,2% en incluant

les troubles induits par une addiction). Ces résultats indiquent clairement que contrairement à une idée assez répandue, les comorbidités psychiatriques des patients dépendants de substances psychoactives ne doivent surtout pas être l'objet d'une abstention thérapeutique au motif qu'elles seraient le plus souvent secondaires.

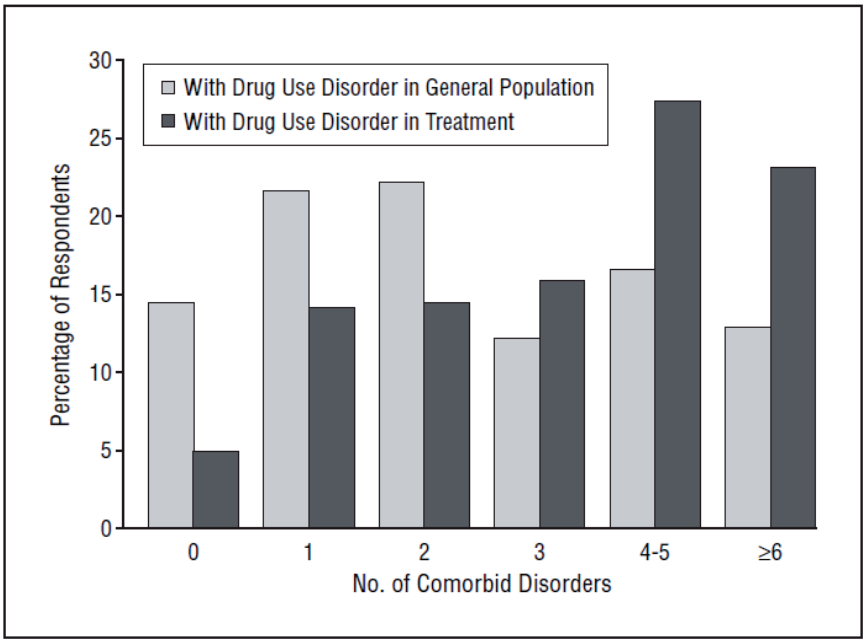


Figure 3. Nombre de comorbidités psychiatriques retrouvées chez les sujets dépendants de substances psychoactives (en pourcentage des personnes interviewées, *respondants*) pour : (i) l'ensemble de la population (« *in general population* ») & (ii) pour ceux des sondés ayant été en recherche, au cours de leur vie, d'une prise en charge, d'un traitement ou d'une aide (« *in treatment* »). Données de l'étude *National Epidemiologic Survey on Alcohol and related conditions* NESARC ((Compton et al., 2007)).

Puis les données de l'étude NESARC ont été analysées en détail pour les personnes ayant eu au cours de leur vie une consommation abusive ou une dépendance aux opiacés (Grella et al., 2009). De façon très intéressante, la comorbidité d'EDM était très comparable à celle retrouvée pour l'ensemble des drogues d'abus, soit 51,5%. Une forte comorbidité de troubles anxieux (40%) et de troubles de la personnalité (50%, dont un tiers de personnalité antisociale) était également retrouvée, mais ceci sort du cadre de notre travail. Soulignons enfin le problème des polyconsommations, quasi-constantes en cas de dépendance aux opiacés, avec 63, 20 et 18% des patients dépendants de l'alcool, du THC ou de la cocaïne, respectivement. Nous avons vu que la dépression est 2 fois plus fréquente chez la femme que chez l'homme. De même, l'étude NESARC révèle en cas de dépendance aux opiacés, un risque 2 fois plus important d'EDM chez la femme que chez l'homme (OR≈2). Enfin, les polyconsommations sont moins fréquentes chez la femme, avec un risque diminué d'abus de cocaïne ou de THC et de dépendance à l'alcool.

L'ensemble de ces études épidémiologiques retrouve, quels que soient les critères diagnostiques utilisés, une comorbidité significative entre dépression et dépendance aux opiacés. La taille des échantillons analysés fait la force de ces grandes séries statistiques, alors que leur caractère rétrospectif reste l'objet de critiques. Les études prospectives permettent classiquement de dépasser cette dernière critique et notamment d'argumenter sur la relation causale entre 2 pathologies comorbides. Nous citerons ici des études épidémiologiques (prolongeant les études que nous venons de décrire, sous la forme d'une deuxième interview) et des études cliniques, de suivi de cohortes.

Tout d'abord, l'étude de Swendsen et collaborateurs (NCS-2 ; (Swendsen et al., 2010)) a consisté en une seconde interview 10 ans plus tard de 5001 personnes déjà interviewées dans le cadre de l'étude NCS, avec comme objectif d'examiner le rôle d'un trouble mental primaire sur l'émergence ultérieure d'une dépendance. Bien que cette étude ne différencie que 3 catégories de dépendance (nicotine, alcool et drogues illicites), elle montre que la préexistence d'un désordre émotionnel est associée avec une prévalence significativement accrue d'apparition d'une dépendance au cours des 10 années suivantes et constitue donc un facteur de risque à part entière. Enfin, cette étude suggère que concernant la dépendance aux drogues illicites, le trouble primaire agirait plutôt sur l'initiation de l'usage de drogue que sur l'entrée dans la dépendance stricto sensu.

L'étude NESARC a également fait l'objet d'un suivi prospectif sur 3 ans pour 34653 personnes (Grant et al., 2009). A nouveau le distinguo n'est pas fait entre les différentes drogues d'abus. Les dépendances ne prédisaient pas les troubles dépressifs alors qu'au contraire, le trouble bipolaire prédisait l'abus de drogue (et le trouble panique, la dépendance). Les données de ces 2 études épidémiologiques prospectives vont dans le sens de l'hypothèse de l'automédication, selon laquelle les patients souffrant de symptômes dépressifs trouvent dans l'usage de substances psychoactives une « béquille » thérapeutique, même imparfaite.

L'étude australienne ATOS s'est intéressée à la prévalence de la dépression chez des sujets dépendants des opiacés à la recherche ou non d'un traitement de substitution (Teesson et al., 2005). Leurs résultats concordent avec ceux des grandes séries épidémiologiques que nous venons de voir et ceux d'autres études plus anciennes (Rounsaville and Kleber, 1985). Ils montrent que les sujets entrant dans une démarche de traitement pour leur dépendance ont présenté dans 26% des cas un EDM lors du mois précédent l'entrée en traitement, contre 15% pour le groupe non traité, alors même que les usages de drogues ne différaient pas significativement entre ces deux groupes. Cette différence était significative (33,5 contre 13%) uniquement pour les femmes. Ces résultats confirment clairement que la demande de prise en charge chez le sujet dépendant des opiacés est un signe de gravité qui impose impérativement la recherche d'une comorbidité dépressive.

De plus, des études longitudinales cliniques étayent cette comorbidité. Chez l'adolescent (autour de 15 ans), une étude longitudinale sur 5 ans a montré que l'EDM prédit la survenue d'une dépendance, toutes drogues confondues (Rao et al., 2009). La dépression pourrait prédire la survenue d'une dépendance à l'alcool chez l'adolescent (Pardini et al., 2007) et chez l'adulte (Dixit and Crum, 2000). Ces données confortent l'hypothèse de l'automédication. De façon complémentaire, la dépendance au cannabis (Hayatbakhsh et al., 2007) ou toutes drogues confondues (Rao et al.,

2000) prédiraient également la survenue d'épisodes dépressifs. Ainsi la relation causale serait bidirectionnelle entre dépression et dépendance. Cependant nous n'avons pas connaissance d'études prospectives spécifiquement consacrées à la dépendance aux opiacés. Il est probable que sa faible prévalence dans la population générale rend difficile en pratique la constitution de cohortes assez importantes pour assurer une puissance statistique significative.

4. Traitement

La prise en charge de ce double diagnostic nécessite la collaboration de nombreux professionnels : psychiatre, pharmacien (TSO), spécialiste de maladies infectieuses (hépatites virales), infirmier, psychologue, travailleur social. Dans une situation clinique aussi complexe, faisant intervenir une telle diversité d'acteurs, les fonctions de coordination des soins et de prise en charge globale, spécifiques du médecin généraliste, prennent tout leur sens.

a) Traitement de substitution aux opiacés (TSO)

Face aux données innombrables appuyant la comorbidité entre dépression et addiction aux opiacés, se pose inévitablement la question de l'impact du type de traitement de substitution utilisé sur le fonctionnement psychique et cognitif et en particulier sur une symptomatologie dépressive concomitante. Etant donnés les éléments sur la mortalité, le maintien en traitement, l'usage d'opiacés illicites que nous avons énumérés précédemment, il n'est pas surprenant de constater que l'initiation d'un TSO est classiquement considéré comme s'associant à une amélioration de la symptomatologie dépressive. Plusieurs facteurs peuvent ici intervenir, comme la réduction d'effets toxiques liés aux opiacés illicites ou du stress lié à une situation socioprofessionnelle dégradée. De plus, le TSO pourrait exercer un effet pharmacologique direct sur cette symptomatologie, et les agonistes opiacés ont été souvent suggérés comme antidépresseurs (la « cure opioïde » ; voir par exemple (Tenore, 2008)). Des études d'imagerie fonctionnelle montrent que l'activité du récepteur mu est associée chez l'homme à la régulation de l'humeur (Kennedy et al., 2006; Zubieta et al., 2003). Les TSO sont également susceptibles de normaliser le fonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS, voir l'article 2), dont le rôle dans les désordres liés au stress comme la dépression est reconnu et qui se trouve perturbé chez les sujets dépendants des opiacés (Kreek, 2001). Néanmoins cette normalisation de l'activité de l'axe HHS pourrait rester dissociée de l'évolution des symptômes dépressifs (Kakko et al., 2008). Enfin nous avons déjà mentionné que pour certains auteurs, la recherche d'un TSO est corrélée avec une prévalence augmentée de la dépression, qui pourrait s'associer à une augmentation du maintien en traitement (Joe et al., 1999). Les symptômes dépressifs seraient ainsi à la fois un facteur pronostic négatif, un facteur motivationnel pour entrer dans un programme thérapeutique et un élément interférant avec leur efficacité (Nunes et al., 2004).

De façon surprenante, la littérature abordant plus spécifiquement la comparaison entre méthadone et buprénorphine est rare. Il est intéressant de considérer que la buprénorphine, outre son

activité agoniste pour le récepteur mu, est également un antagoniste du récepteur kappa. Sachant que l'activation du récepteur kappa a un effet dysphorique (Walsh et al., 2001), cette propriété de la buprénorphine pourrait lui conférer un effet positif sur l'humeur plus puissant que pour la méthadone.

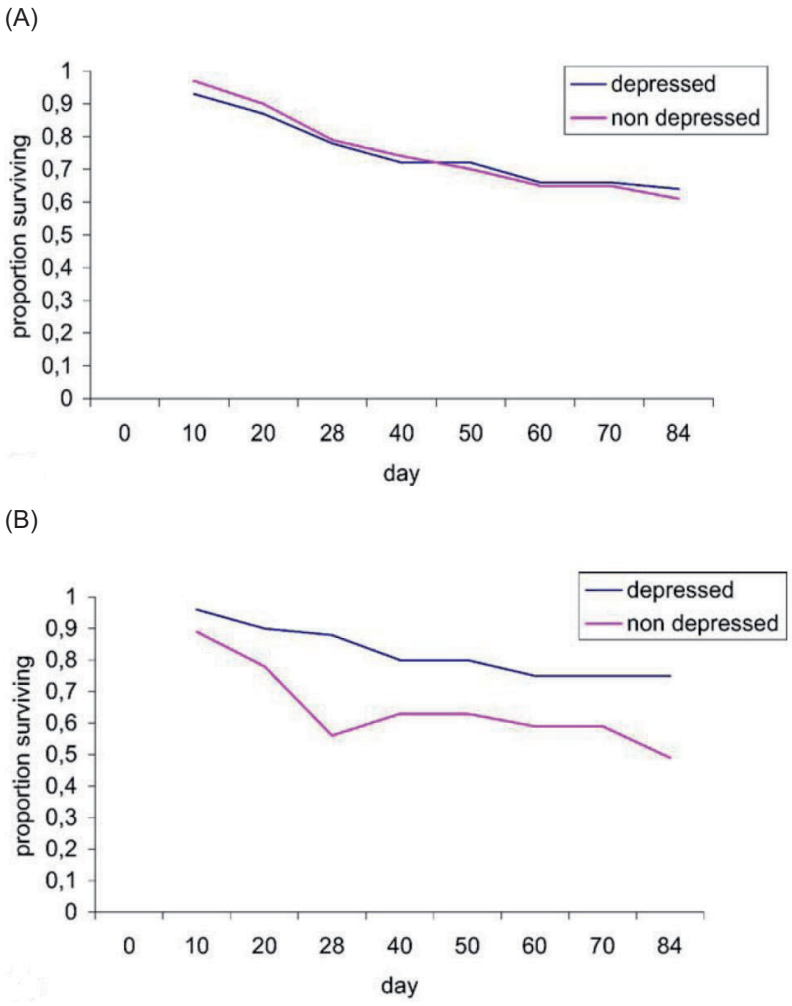


Figure 4. Courbes de survie (maintien en traitement) de patients suivant un traitement de substitution par méthadone (A) ou par buprénorphine (B), en présence (*depressed*) ou non (*non depressed*) d'un diagnostic de dépression selon les critères du DSM-IV ((Gerra et al., 2004)).

Gerra et collaborateurs ont comparé dans une étude non randomisée 78 et 76 patients sous traitement substitutif par méthadone ou buprénorphine, respectivement (Gerra et al., 2004). Outre les indicateurs habituels, ils se sont intéressés aux éventuels facteurs prédictifs du taux de rétention en traitement, de l'usage d'opiacés illicites, de l'amélioration de la symptomatologie psychiatrique. Sur 12 semaines, le taux de rétention était légèrement inférieur pour la buprénorphine comparée à la méthadone, en accord avec d'autres travaux (voir chapitre I).

Il est particulièrement remarquable que l'efficacité du traitement par la buprénorphine, contrairement à la méthadone, soit corrélée avec :

- la présence ou non d'un EDM (figure 4)

- l'intensité des symptômes dépressifs au début du traitement, mesurée par l'échelle SCL-90 (pour *symptom check-list 90 scale*, qui permet une évaluation psychopathologique large). Les patients ayant, selon cette échelle, des scores de dépression plus élevés présentaient par la suite une meilleure rétention en traitement. De plus, ce score était significativement amélioré par les 2 TSO, mais avec un effet plus marqué pour la buprénorphine. Ces résultats suggèrent que la buprénorphine pourrait être (i) plus efficace que la méthadone concernant l'amélioration de symptômes dépressifs et (ii) particulièrement indiquée chez les patients présentant une symptomatologie lourde.

Dans leur étude suivante, les mêmes auteurs ont comparé l'efficacité de la buprénorphine seule comparée à l'efficacité de la buprénorphine couplée avec la naltrexone (Gerra et al., 2006). Ils montrent que la double thérapie (supposée, selon les auteurs, résulter en un effet pharmacologique majoritairement antagoniste pour le récepteur kappa) est plus efficace que la buprénorphine seule, à la fois en terme de rétention en traitement et sur les scores d'irritabilité, de dépression et de fatigue de l'échelle SCL-90. Une autre étude rapporte une forte efficacité de la combinaison buprénorphine/naltrexone sur la rétention en traitement à 12 semaines (33%), mais cette étude n'incluait pas de groupe contrôle suivant un traitement par buprénorphine seule (Rothman et al., 2000). Ces résultats contrastent avec ceux d'une autre étude, très puissante car randomisée et effectuée en double aveugle, qui ne montre pas de différence d'efficacité entre ces modalités sur les symptômes de manque ou l'évaluation (par le patient ou le clinicien) d'une impression de « bien-être général » (Fudala et al., 2003). Néanmoins cette dernière étude n'interrogeait pas directement les symptômes dépressifs.

b) Traitement antidépresseur

L'efficacité des antidépresseurs en cas de double diagnostic reste à l'heure actuelle très discutée (Nunes et al., 2004). Les études disponibles, souvent américaines, s'intéressent à cette question dans le cadre d'un traitement par méthadone, ce TSO étant historiquement largement dominant outre-Atlantique. Les résultats sont contradictoires. Deux études anciennes (Titievsky et al., 1982; Woody et al., 1975) indiquaient un effet positif d'un traitement antidépresseur par un tricyclique, la doxépine. Par la suite, des études concernant des patients sous TSO par méthadone et consommant de la cocaïne, ne retrouvaient pas d'effet de la désipramine (un métabolite de l'imipramine non commercialisé en France ; (Arndt et al., 1992; Ziedonis and Kosten, 1991)) ou du bupropion (un inhibiteur de la recapture de la noradrénaline et de la dopamine indiqué dans le sevrage tabagique ; (Margolin et al., 1995)) sur les symptômes dépressifs (même si ces études n'étaient pas spécifiquement conçues dans cette optique, mais plutôt pour évaluer l'effet de l'antidépresseur sur la consommation concomitante de cocaïne).

Plus récemment, des études centrées sur la dépression n'ont pas apporté de conclusion claire, avec parfois un effet positif par rapport au placebo (imipramine, (Nunes et al., 1998)), parfois pas d'effet (sertraline, (Carpenter et al., 2004); FLX, (Dean et al., 2002); (Petrakis et al., 1998)) de

l'antidépresseur étudié. Cette variabilité des résultats pourrait s'expliquer par une variation de l'importance de l'effet placébo entre les différentes études, ou encore par l'hétérogénéité des populations étudiées. Les études retrouvant un effet bénéfique utilisaient un antidépresseur imipraminique, alors que les études ne retrouvant pas d'effet utilisaient un ISRS. Mais les imipraminiques induisaient plus fréquemment des effets secondaires (Nunes et al., 2004). Au total, on peut considérer qu'une pharmacothérapie par antidépresseur de la dépression, en cas de TSO par méthadone, présente une efficacité modérée (Nunes et al., 2004). Des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer (i) l'efficacité des différents antidépresseurs lors d'un TSO par buprénorphine et (ii) les facteurs prédictifs de la réponse thérapeutique, qui permettraient de déterminer dans l'ensemble des patients présentant une comorbidité, ceux qu'il convient de traiter.

INTRODUCTION

CHAPITRE IV. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA COMORBIDITE ENTRE DEPENDANCE AUX OPIACES ET DEPRESSION

Nous avons vu que les données cliniques et épidémiologiques affirment l'importance de la comorbidité entre dépression et dépendance aux opiacés. Nous avons vu également que la prise en charge de ces patients est difficile, avec des rechutes fréquentes, correspondant à une reprise des consommations d'opiacés et une réexposition aux conduites à risque associées. Les TSO ne sont qu'une substitution, la dépendance restant latente. Ces difficultés soulignent la nécessité d'approfondir notre compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans chacune de ces pathologies. La fréquence du double diagnostic pose également la question des liens étiopathogéniques entre ces deux entités, qui on fait l'objet de nombreuses hypothèses. Il s'agit notamment de savoir quel trouble précède l'autre, s'il en est la cause ou s'ils partagent tous deux les mêmes facteurs de risque. Ainsi une prédisposition génétique ou des déterminants socio-économiques communs pourraient expliquer la fréquence de ce double diagnostic. Ou encore, ces 2 pathologies pourraient mettre en jeu des mécanismes neurobiologiques et des structures cérébrales communes et l'apparition d'un trouble favoriserait celle de l'autre.

Il n'est pas question ici de réaliser une revue exhaustive de l'immense littérature abordant la physiopathologie, qui de la dépression, qui de la dépendance aux opiacés. Néanmoins, nous nous proposons de parcourir les données actuelles permettant de spéculer sur la cooccurrence de ces troubles, en assumant le caractère probablement arbitraire des choix effectués. Notamment, nous sommes bien conscients du fait que la symptomatologie dépressive très polymorphe traduit vraisemblablement l'implication de nombreuses structures et systèmes de neurotransmission cérébraux, largement commentée par les auteurs faisant référence (Belmaker and Agam, 2008; Krishnan and Nestler, 2008; Nestler et al., 2002; Price and Drevets, 2010).

Nous définirons tout d'abord le système opioïde, que nous proposons comme un acteur majeur de la comorbidité. Puis nous décrirons rapidement les principales hypothèses physiopathologiques de nos 2 pathologies d'intérêt. L'hypothèse sérotoninergique de la dépression et le rôle du système sérotoninergique lors de l'abstinence aux opiacés ont fait l'objet d'une attention particulière dans notre modèle murin, et seront développés majoritairement. Nous discuterons enfin les nombreuses données montrant que les 3 récepteurs aux opioïdes (mu, kappa et delta) exercent des contrôles distincts sur le système de récompense, l'état hédonique, les comportements sociaux qui sont tous impliqués dans la dépression et la dépendance aux opiacés (voir l'article 1, à la fin de ce chapitre). Ces 3 récepteurs constituent ainsi des cibles, à la fois sur le plan thérapeutique et dans l'étude des mécanismes de la comorbidité (voir nos données sur l'abstinence à l'héroïne, chapitre VI).

1. Le système opioïde, acteur majeur de la comorbidité ?

a) Récepteurs et ligands du système opioïde

Le système opioïde est un système neuromodulateur composé de 3 récepteurs, activés par les peptides opioïdes endogènes (figure 5).

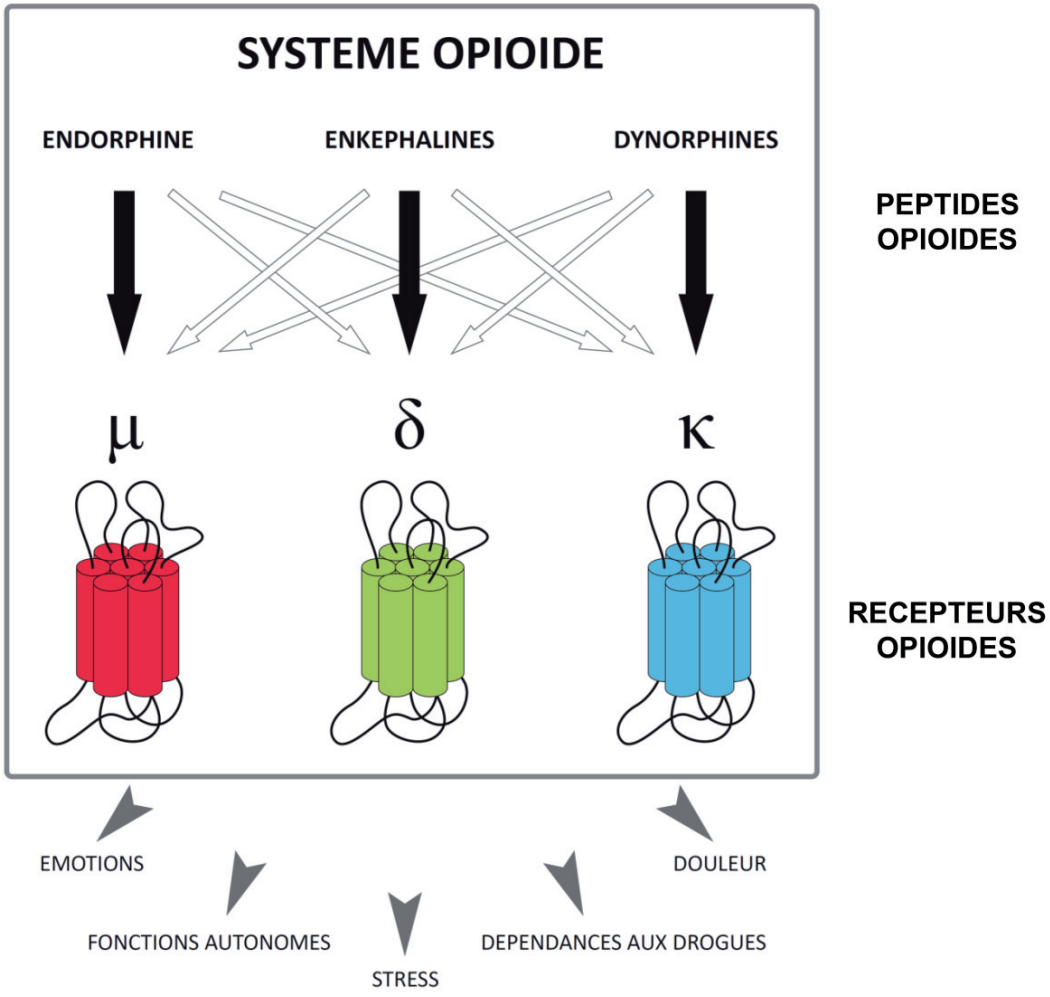


Figure 5. Le système opioïde. Les trois types de peptides opioïdes endogènes peuvent se lier sur les trois types de récepteurs opioïdes pour moduler de nombreuses fonctions physiologiques (X. Rezaï & D. Massotte).

Le système opioïde est impliqué dans de très nombreux comportements et fonctions physiologiques (Bodnar, 2011): contrôle de la douleur, stress, mémoire, prise alimentaire, transit intestinal, etc… En particulier, il est important de considérer dans la perspective du présent travail de thèse que chacun des 3 récepteurs opioïdes exerce un contrôle déterminant sur les fonctions de récompense, le tonus hédonique et les états de type dépressif chez la souris, le rat et le primate. Les

études chez l'homme, essentiellement d'imagerie et sur tissus post-mortem, confortent en partie ces résultats. Nous avons résumé ces données dans une revue de la littérature (voir l'article 1).

Il existe **3 récepteurs opioïdes** : mu, kappa et delta. Dans les années 1990, le clonage des gènes des récepteurs opioïdes a permis d'identifier les séquences protéiques de ces récepteurs.

Figure 6. Homologie de séquence protéique des récepteurs opioïdes murins mu (mMOR), delta (mDOR) et kappa (mKOR). I et E indiquent les boucles intra- et extra-cellulaires ; C et N terminale indiquent les extrémités C- et N-terminales, respectivement intra- et extra-cellulaires (Figure : X. Rezaï & D. Massotte).

Le récepteur delta fut le premier des récepteurs opioïdes à être cloné simultanément dans deux laboratoires (Evans et al., 1992 ; Kieffer et al., 1992). Les récepteurs opioïdes mu et kappa furent ensuite clonés par homologie avec le récepteur delta (Kieffer, 1995). Les gènes codant pour le récepteur mu (*Oprm1*), le récepteur delta (*Oprd1*) et le récepteur kappa (*Oprk1*), sont situés sur des chromosomes distincts (10, 4 et 1 chez la souris; 6, 1 et 8 chez l'homme). Les gènes *Oprd1 et Oprk1* possèdent chacun trois exons, alors que le gène *Oprm1* possède un quatrième exon (Befort et al., 1994 ; Simonin et al., 1995; Wang et al., 1994 ; Yasuda et al., 1994).

L'analyse de la séquence d'acides aminés des récepteurs opioïdes révèle 61% d'homologie entre les récepteurs mu, delta et kappa (figure 6). La partie centrale des trois séquences contient sept domaines transmembranaires conservés (73 à 76% d'homologie), caractéristiques des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) (Chaturvedi et al., 2000; Surratt and Adams, 2005). Les RCPG représentent, chez les mammifères, la plus grande famille de récepteurs présents à la surface des cellules. En effet, ils sont codés par 3,4% du génome humain, ce qui représente plus de 900 gènes différents (Bockaert and Pin, 1999). De par leur diversité, ils représentent une interface privilégiée entre la cellule et son environnement. Ils sont répartis en six classes (A à F) et peuvent être activés par différents stimuli, notamment les photons, les odeurs, des hormones ou des neurotransmetteurs (Fredriksson et al., 2003). Les RCPG sont caractérisés par une structure conservée, comprenant :

-sept domaines transmembranaires, formés d'hélices α et reliés par 3 boucles intra- et 3 boucles extracellulaires,

-une extrémité C terminale intracellulaire, site d'interaction avec les partenaires du récepteur, et notamment les protéines G,

-une extrémité N terminale extracellulaire, qui interagit avec les ligands et dont la taille varie selon les RCPG.

Les récepteurs opioïdes sont des RCPG de classe A (Fredriksson et al., 2003). Leurs parties extra-cellulaires (extrémité N terminale et boucles extra-cellulaires) qui participent aux premières étapes de la liaison du ligand, sont les parties présentant le plus de variation entre les récepteurs (9 à 10% d'homologie). Les sept parties transmembranaires participent à la liaison du ligand et sont importantes pour la transmission du signal entre les parties N et C terminales (Law et al., 1999). Enfin, la partie C terminale représente le site d'interaction avec les protéines G. Ce domaine sert également à la modulation de l'activité du récepteur au travers des sites de phosphorylation par différentes kinases (Decaillot et al., 2003). La modulation de l'activité et du nombre de récepteurs après leur activation aiguë ou chronique a d'ailleurs été associée, au niveau physiologique, aux phénomènes de tolérance et de sensibilisation (Johnson et al., 2005). Mais outre ces mécanismes cellulaires de régulation, il faut également prendre en compte le profil de distribution anatomique des récepteurs et de leurs ligands pour comprendre l'action des opioïdes.

Les récepteurs opioïdes sont des RCPG couplés aux protéines G de type $G_{i/o}$, dont l'activation induit globalement une diminution de l'activité neuronale. Les protéines $G_{i/o}$ sont des hétérotrimères composés de 3 sous-unités : α, β et γ. L'activation d'un récepteur opioïde induit la liaison à une protéine G_i. Se produit alors une hydrolyse d'ATP qui permet la dissociation de la sous-unité α du complexe β/γ (Oldham and Hamm, 2008). La sous-unité α_i est un inhibiteur de l'adénylate cyclase,

l'enzyme responsable de la synthèse d'AMP cyclique (AMPc) ; l'AMPc étant lui-même un activateur de la protéine kinase A (PKA) et par conséquent de nombreuses voies de signalisation intracellulaires. Le complexe β/γ a également de nombreuses cibles, que nous ne ferons qu'énumérer ici : phospholipase C, protéine kinase C, modulation de canaux calciques ou potassiques (GIRK pour *G-inward rectifying current*).

En conditions physiologiques, ces 3 récepteurs sont la cible de **peptides opioïdes endogènes** (figure 7) avec lesquels ils constituent le système opioïde (Le Merrer et al., 2009). Chez les mammifères, les peptides opioïdes sont produits à partir de trois précurseurs: proenkephaline (PENK), proopiomelanocortine (POMC) et prodynorphine (PDYN). Les gènes codant pour ces précurseurs ont été clonés avant les gènes pour les récepteurs (Comb et al., 1982 ; Kakidani et al., 1982; Nakanishi et al., 1979). Ces précurseurs sont clivés par différentes endopeptidases en différentes combinaisons de peptides actifs (figure 7).

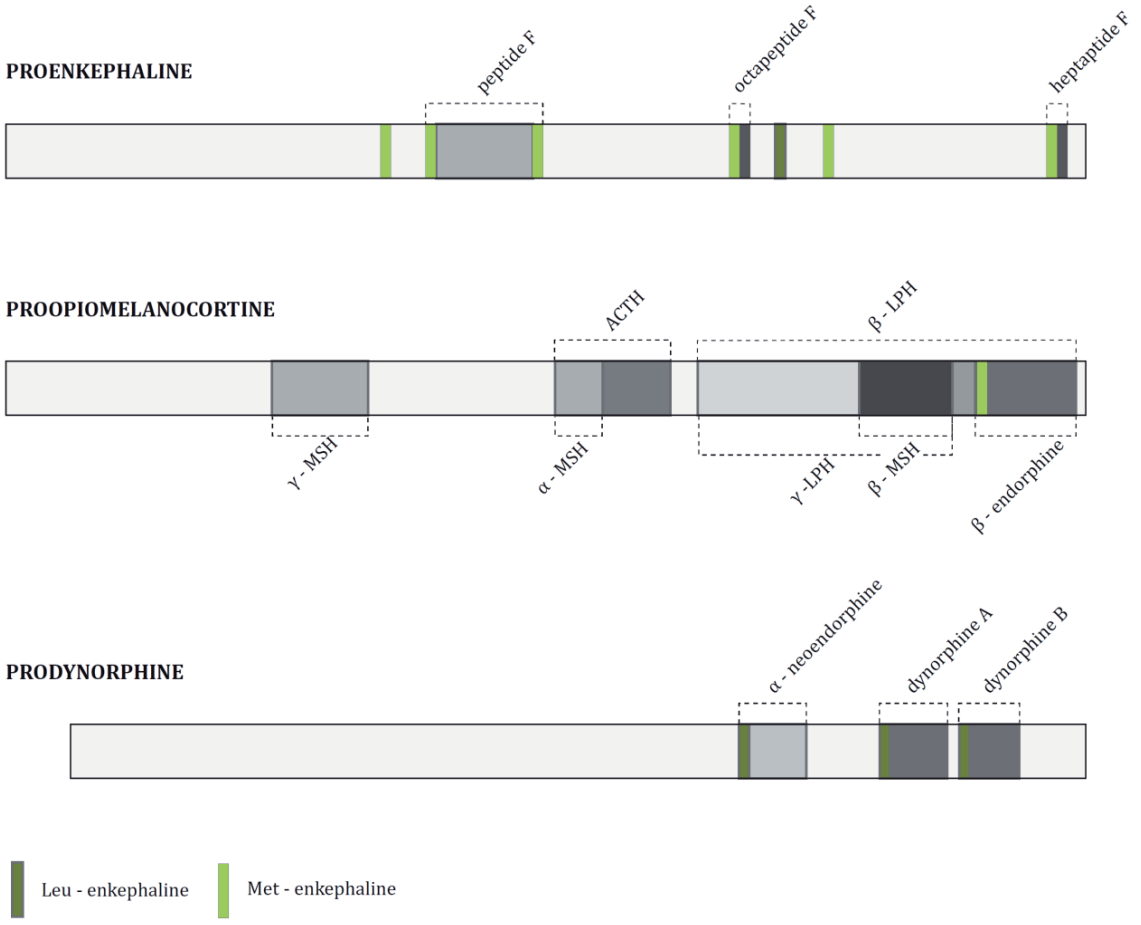


Figure 7. Les peptides opioïdes endogènes sont synthétisés à partir de 3 gènes : proenkephalin, proopiomélanocortin et prodynorphin. La transcription de ces 3 gènes produit des prépropeptides qui sont ensuite clivés par des endopeptidases en divers fragments correspondant aux peptides opioïdes endogènes. (figure : X. Rezaï & D. Massotte)

Le gène de la PENK code pour un prépropeptide de 267 acides aminés contenant six copies de met-enképhaline et une copie de leu-enképhaline (Rossier, 1993). D'autres clivages peuvent aboutir à la formation d'un heptapeptide, d'un octapeptide, du peptide E ou du peptide F. La dégradation des enképhalines se fait par des aminopeptidases N (Irazusta et al., 2003) et des enképhalinases (Hersh, 1984). Le gène de la POMC code pour un précurseur de 267 acides aminés qui donne, après clivage, une copie de β-endorphine (Young et al., 1993), une copie d'adrénocorticotropine (ACTH) et plusieurs peptides « stimulant les mélanocytes » (α-MSH, β-MSH et γ-MSH). La β-endorphine [1-31] peut être clivée en β-endorphine [1-27], ou en γ-endorphine [1-17] et α-endorphine [1-16]. Ces deux derniers composés se lient aux récepteurs opioïdes avec une affinité plus faible que la β-endorphine (de Wied, 1990). La dégradation par des peptidases est possible mais peu efficace, les endorphines étant majoritairement inactivées par acétylation (Deakin et al., 1980). Le gène de la PDYN code pour un précurseur de 245 acides aminés, qui est clivé en Leu-enképhaline, dynorphine A et dynorphine B (Day et al., 1993). Ce précurseur est synthétisé dans le cerveau, en particulier dans l'hypophyse antérieure et postérieure où il subira des maturations différentes (Seizinger et al., 1984). La dégradation de la dynorphine se fait par l'action d'aminopeptidases.

Ces 3 peptides opioïdes endogènes (enképhalines, β-endorphine et dynorphines) sont les principaux peptides issus des trois précurseurs, mais il en existe en réalité une trentaine (Akil et al., 1998). La plupart possèdent le « motif opioïde » à l'extrémité amino-terminale Tyr-Gly-Gly-Phe-(Met/Leu) et contiennent entre 5 et 31 acides aminés. Les trois peptides endogènes peuvent chacun activer les trois récepteurs opioïdes. Cependant, les enképhalines et la β-endorphine ont une affinité moindre pour le récepteur kappa (Loh et al., 1976) qui est activé plus spécifiquement par la dynorphine (Goldstein et al., 1979). Le système dynorphin-kappa constitue donc un sous-système au sein du système opioïde.

Par ailleurs, la morphine pourrait également être un ligand endogène. Sa présence dans le cerveau (Goumon and Stefano, 2000; Laux et al., 2011) et une voie de biosynthèse (Grobe et al., 2010) ont été caractérisées chez plusieurs mammifères dont la souris. La morphine endogène pourrait également être sécrétée par les cellules chromaffines (Goumon et al., 2006) et les cellules immunitaires (Zhu et al., 2005).

Le système opioïde est présent essentiellement au niveau du système nerveux. En dehors du système nerveux, les cellules immunitaires expriment les récepteurs opioïdes (Chuang et al., 1995; Gaveriaux et al., 1995). On trouve également les récepteurs delta et kappa dans les endothéliums vasculaires (Stefano et al., 1998) et dans les épithéliums intestinaux (Pol et al., 2003) et cutanés (Salemi et al., 2005). Pour le système nerveux périphérique, les trois types de récepteurs sont présents dans la cochlée (Jongkamonwiwat et al., 2003), les plexus nerveux du tractus gastro-intestinal (Bagnol et al., 1997), les neurones sensoriels et les ganglions rachidiens (Stein and Lang, 2009). Dans le système nerveux central, les trois types de récepteurs sont exprimés dans les couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière (Besse et al., 1991; Mansour et al., 1995a), ainsi que dans de nombreuses structures cérébrales. La distribution cérébrale des récepteurs et des ligands opioïdes a été déterminée grâce à des études d'immunohistochimie (Fallon and Leslie, 1986; Khachaturian et al., 1982; Khachaturian et al., 1983; Mansour et al., 1995b), d'autoradiographie

(Kitchen et al., 1997; Mansour et al., 1987; Slowe et al., 1999) et d'hybridation in situ (DePaoli et al., 1994; Harlan et al., 1987; Mansour et al., 1994; Merchenthaler et al., 1997; Zastawny et al., 1994). Ces différentes études ont permis de dresser le profil de distribution du système opioïde présenté dans la figure 8.

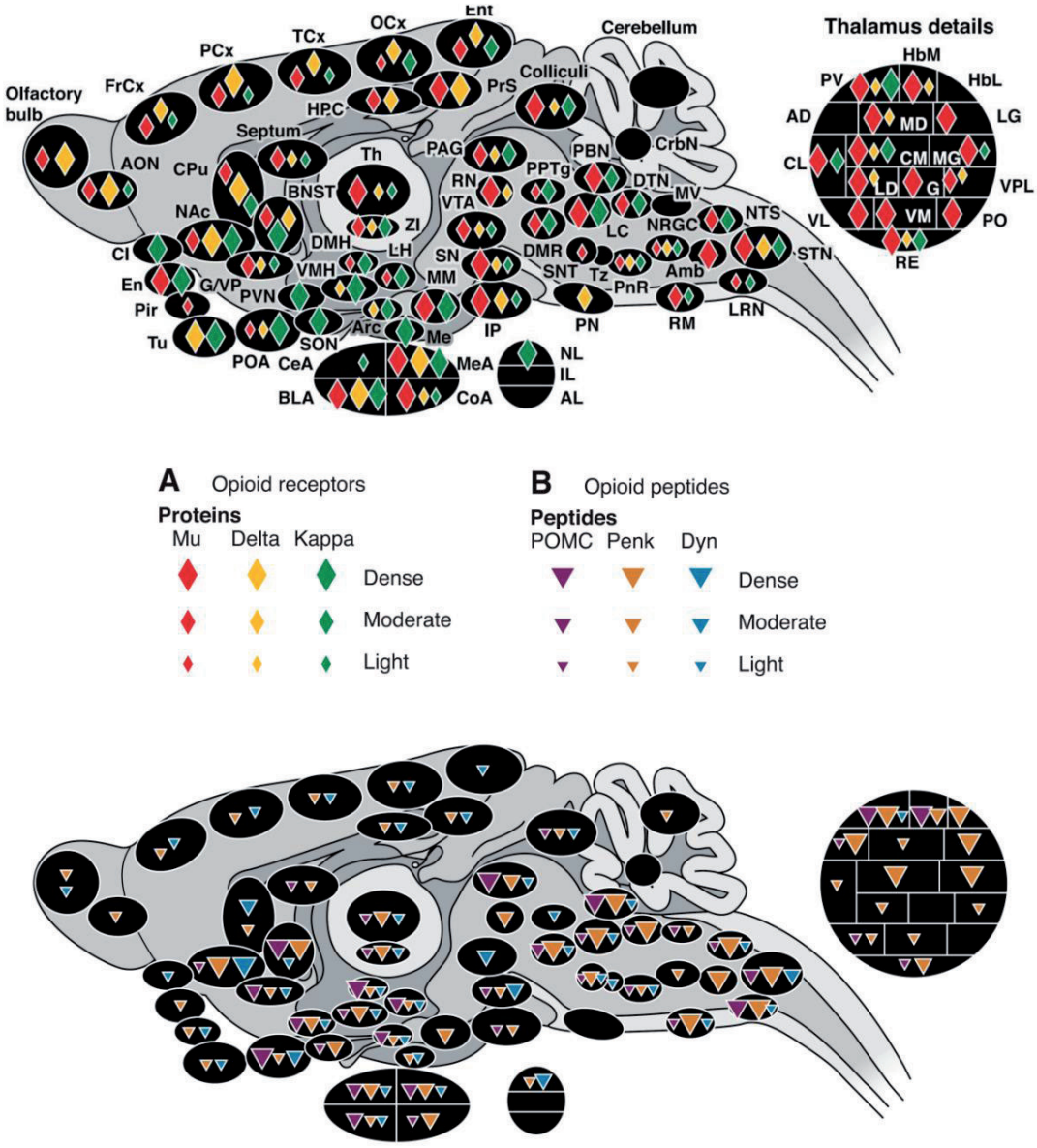


Figure 8. Distribution des récepteurs (A) et peptides (B) opioïdes dans le cerveau (rat et souris, voir (Le Merrer et al., 2009). Seules les régions pour lesquels des données sont disponibles dans la littérature sont représentées. Les densités sont représentées par des symboles de tailles différentes, selon 3 niveaux, de faible à fort. Amb, noyau ambiguus; AD, thalamus antérodorsal; AL, lobe antérieure de l'hypophyse; AON, noyau olfactif antérieur; Arc, noyau arqué de l'hypothalamus; BLA, noyau baso-latéral de l'amygdale; BNST, noyau du lit de la strie terminale; CeA, noyau centarl de l'amygdale; Cl, claustrum; CL, thalamus centrolatéral; CM, thalamus centromédial; CoA, noyau

cortical de l'amygdale; CPu, noyau caudé/putamen; CrbN, noyaux cérébelleux; DMH, hypothalamus dorsomédial; DMR, noyaux dorsal et médian du raphé; DTN, noyau tegmental dorsal; En, cortex endopiriforme; Ent, cortex entorhinal; FrCx, cortex frontal; G, noyau gelatinosus du thalamus; G/VP, globus pallidus/pallidum ventral; HbL, habenula latérale; HbM, habenula médiale; HPC, hippocampe; IL, lobe intermédiaire de l'hypophyse; IP, noyau interpédonculaire; LC, locus coeruleus; LD, thalamus latérodorsal; LG, noyau géniculé latéral du thalamus; LH, hypothalamus latéral; LRN, noyau réticulé latéral; MD, thalamus médiodorsal; Me, éminence median; MEA, noyau médian de l'amygdale; MG, noyau géniculé latéral du thalamus; MM, noyau mammillaire médial; MV, noyau vestibulaire médial; NAc, noyau accumbens; NL, lobe neuronal de l'hypophyse; NRGC, noyau réticulé giganto-cellulaire; NTS, noyau du tractus solitaire; OCx, cortex occipital; PAG, substance grise périaqueducale; PCx, cortex pariétal; Pir, cortex piriforme; PN, noyau du pont; PnR, réticulée du pont; PO, thalamus postérieure; POA, aire préoptique; PPTg, noyau pédonculo-pontin; PrS, présubiculum; PV, thalamus paraventriculaire; PVN, hypothalamus paraventriculaire; RE, thalamus reuniens; RN, noyau rouge; RM, raphé magnus; SON, noyau supraoptique; SN, substance noire; SNT, noyau sensoriel trigéminé; STN, noyau spinal trigéminé; TCx, cortex temporal; Th, thalamus; Tu, tubercule olfactif; Tz, noyau trapézoïde; VL, thalamus ventrolatéral; VM, thalamus ventromédial; VMH, hypothalamus ventromédial; VPL, thalamus ventropostérolatéral; VTA, aire tegmentale ventrale; ZI, zona incerta.

Tout d'abord, on retrouve les trois types de récepteurs opioïdes dans le cortex, certaines structures du système limbique et du tronc cérébral. Le récepteur mu est entre autre exprimé au niveau du thalamus, du striatum, de l'hippocampe, du locus coeruleus et des noyaux du raphé, entre autres. De même, le récepteur kappa est exprimé au niveau du noyau du tractus solitaire, mais aussi au niveau de l'aire tegmentale ventrale et de l'hypothalamus. Le récepteur delta enfin est exprimé plus particulièrement au niveau du cortex, du tractus olfactif et de l'amygdale (basolatérale, corticale et médiane), ainsi que dans le striatum (noyau accumbens et caudé putamen), dans le globus pallidus, la bande diagonale, le septum et l'hippocampe. Le lecteur trouvera une représentation plus synthétique des niveaux relatifs d'expression de ces 3 récepteurs dans différentes régions dans l'article 1, figure 2D. La distribution des corps cellulaires et des terminaisons exprimant les peptides opioïdes endogènes recoupent largement les régions où les récepteurs sont exprimés. PENK est le précurseur le plus abondant et le plus largement distribué, on le trouve notamment dans le striatum et le globus pallidus. PDYN est particulièrement présent dans le noyau accumbens, mais aussi largement distribué dans tout le cerveau. POMC possède le profil le plus restreint puisqu'il est exprimé dans des neurones situés exclusivement au niveau de trois régions du cerveau : le noyau arqué de l'hypothalamus, le noyau du tractus solitaire et les lobes antérieurs et intermédiaires de l'hypophyse. Les projections de ces neurones couvrent également une zone restreinte, elles sont notamment absentes des structures corticales en dehors de l'amygdale (Le Merrer et al., 2009).

b) Métabolisme, pharmacocinétique et pharmacodynamique des opiacés d'abus

Nous détaillerons plus loin dans ce manuscrit les effets respectifs de l'abstinence à la morphine et à l'héroïne. Pour cette raison, nous résumons ici les principales propriétés pharmacologiques de ces 2 molécules.

Chez le rongeur, il faut remarquer que la majorité des études publiées s'intéressant à la dépendance aux opiacés utilisent la morphine, au détriment de l'héroïne qui possède pourtant, comme nous l'avons déjà mentionné, un potentiel toxicomanogène plus important. L'héroïne (ou diacétylmorphine) est un produit de synthèse obtenu par diacétylation de la morphine. Le métabolisme de l'héroïne est représenté sur la figure 9. L'héroïne est une molécule lipophile, franchissant rapidement la barrière hémato-encéphalique. Elle est rapidement dé-acétylée en 6-monoacétyl-morphine (6-MAM) et morphine. Sous l'action d'UDP-glucuronosyltransférase (UGT), la morphine est ensuite glucurono-conjuguée, une réaction produisant chez le rongeur uniquement du morphine-3-glucuronide, M3G, inactif sur le récepteur mu (Milne et al., 1996) (le morphine-6-glucuronide, M6G, n'étant retrouvé qu'à l'état de trace après injection systémique de morphine (Handal et al., 2002)). Il est admis que l'héroïne présente une affinité très faible pour le récepteur mu, au contraire de ses métabolites (Selley et al., 2001): la morphine, le 6-MAM et le M6G.

Ces données conduisent parfois à considérer l'héroïne comme une simple pro-drogue, qui permettrait seulement d'atteindre des taux cérébraux plus importants de morphine. Cette conception est remise en cause par des données récentes. Par exemple, le 6-MAM présente une activité agoniste pour le récepteur mu plus puissante que la morphine (Selley et al., 2001). Et l'hyperactivité locomotrice induite chez la souris par l'injection systémique d'héroïne est plus étroitement corrélée avec le taux plasmatique de 6-MAM qu'avec celui de la morphine (Andersen et al., 2009). Les propriétés de récompense du 6-MAM chez la souris et son implication dans les effets de l'héroïne n'ont pas fait l'objet d'autres études à notre connaissance.

Il a été décrit chez des sujets dépendants à l'héroïne une forte augmentation des taux de synthèse de M6G, qui pourrait signaler une adaptation du métabolisme opiacé (Antonilli et al., 2003). Cette adaptation se produirait notamment dans le foie et ne serait pas bloquée par la naltrexone (Graziani et al., 2008). Cet effet pourtant n'a pas été retrouvé chez des patients ayant reçu un traitement morphinique à visée antalgique au long cours (Andersen et al., 2004). Ainsi, la sensibilité à cet effet de l'héroïne sur le métabolisme opiacé pourrait être corrélé avec la vulnérabilité individuelle face à l'addiction, comme suggéré par une étude récente chez le rat (Meringolo et al., 2012).

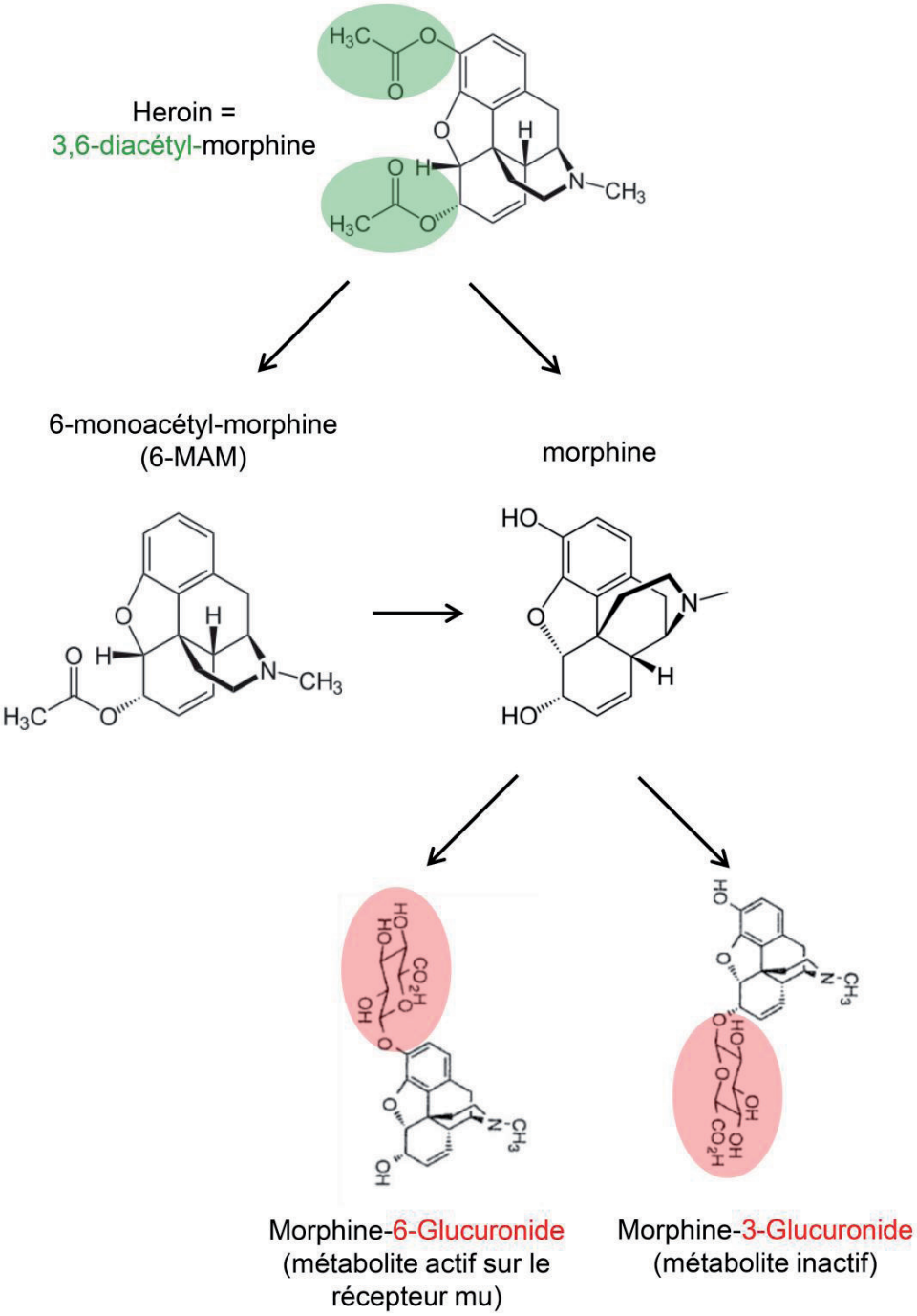


Figure 9. Métabolisme de l'héroïne et de la morphine. Après absorption, l'héroïne est rapidement métabolisée en 6-monoacétyl-morphine (6-MAM) et en morphine. Puis, la morphine est métabolisée en morphine-3-glucuronide (M3G) et morphine-6-glucuronide (M6G). Seuls le 6-MAM, la morphine et le M6G ont une bonne affinité pour le récepteur mu. Chez le rongeur, le métabolisme de la morphine ne produit pas ou très peu de M6G. Le M3G est inactif sur le récepteur mu.

Les opiacés produisent leurs effets euphorisants en activant le récepteur mu. Un traitement chronique par la morphine ou l'héroïne, chez le rat ou la souris, induit une désensibilisation du récepteur mu dans de très nombreuses régions cérébrales (Sim-Selley et al., 2000; Sim-Selley et al., 2007). La persistance à long terme de ces adaptations n'est actuellement pas connue mais elles pourraient induire une modification de la régulation émotionnelle. Par ailleurs, un traitement chronique par la morphine semble induire une potentialisation de l'activité du récepteur delta, par exemple dans l'amygdale (Chieng and Christie, 2009) et dans la substance grise péri-acqueducale (PAG; (Hack et al., 2005)), une région participant à l'expression des signes de sevrage. A nouveau, la persistance à long terme et les conséquences émotionnelles de ce type d'effet sont incertaines. Néanmoins, en modèle animal, la délétion génétique constitutive (*knockout*, KO) de ce gène induit une augmentation de la résignation dans le test de la nage forcée (Filliol et al., 2000). La modification possible de l'activité du récepteur delta au cours de l'abstinence aux opiacés pourrait intervenir dans l'apparition de comorbidités émotionnelles. De tels adaptations de la signalisation du récepteur kappa ont également été décrites suite à une exposition chronique à des opiacés (voir chapitre VI, expérience 3).

2. Physiopathologie de la dépendance aux opiacés

a) Modèles animaux de dépendance aux opiacés

Comme pour toute pathologie psychiatrique dont les déterminants sont complexes et multiples, la modélisation chez le rongeur de la dépendance aux opiacés est une tâche difficile (Sanchis-Segura and Spanagel, 2006). Nous proposons ici une brève revue des modèles éxistants, en prenant le parti de systématiquement discuter leur pertinence par rapport aux critères diagnostiques du DSM-IV mentionnés précedemment. Le modèle le plus simple est celui de l'**administration passive** d'un opiacé, de façon répétée, par des injections réalisées par l'expérimentateur. Ce modèle permet d'étudier leurs effets pharmacologiques directs, avec évidemment le défaut de ne pas rendre compte du comportement volontaire de consommation de la drogue, central chez l'homme, au moins lors des prises initiales. Ce modèle présente néanmoins des avantages. Pour la morphine, il peut induire une dépendance physique forte (Matthes et al., 1996) (critère 2 du DSM-IV). En outre, il est simple à mettre en œuvre, reproductible et la littérature l'utilisant est très abondante.

Un modèle plus élaboré est la **préférence de place conditionnée** (PPC ; (Tzschentke, 1998)). Ce modèle utilise un dispositif comprenant 2 compartiments, dont l'un est associé de manière répétée aux effets de la morphine (exposition passive), l'autre à des injections contrôles de solution saline. Lors du test, le plus souvent en l'absence de réexposition à la drogue, l'animal est replacé dans le dispositif où il peut se déplacer librement. Le temps passé dans le compartiment préalablement associé avec les effets de la morphine est considéré comme une mesure de préférence, permettant d'apprécier son caractère renforçant (Matthes et al., 1996). Néanmoins l'acquisition et l'expression d'un conditionnement fait nécessairement intervenir des composantes mnésique et motivationnelle, qui rendent parfois son interprétation difficile (voir pour un exemple récent et concret, concernant le récepteur opioïde delta: (Chefer and Shippenberg, 2009; Le Merrer et al., 2010)).

Le 3ème modèle que nous décrirons est celui de l'**auto-administration d'opiacés**. Il s'agit probablement du modèle le plus puissant mais aussi le plus lourd sur le plan expérimental. Les animaux, placés dans une boite d'auto-administration, vont incidemment opérer un comportement (appuyer sur un levier chez le rat, passer le museau dans un orifice chez la souris) qui déclenche une injection intraveineuse de morphine (via un cathéter implanté dans la veine jugulaire). Si la contingence entre ce comportement et les effets de l'injection et de la drogue est suffisante, l'animal va répéter ce comportement et ainsi déclencher volontairement ses prises de drogue (il s'agit d'un conditionnement opérant ou instrumental, décrit historiquement par Skinner). Au contraire de la PPC, l'auto-administration permet en l'absence de facteur confondant une mesure du niveau de motivation de l'animal à obtenir la drogue, en utilisant une procédure dite de « ratio progressif ». Au cours de cette procédure, le nombre de comportements nécessaires pour l'obtention d'une récompense croit très rapidement (Salamone and Correa, 2002), et le nombre maximal de comportements effectués par

l'animal pour l'obtention d'une récompense (*break-point*) représente une mesure de son état de motivation. Il a été montré que la répétition quotidienne de sessions d'auto-administration de plusieurs heures induit chez le rat une **escalade de la consommation**, c'est-à-dire l'augmentation progressive des quantités de drogue consommées, un comportement considéré comme reflétant la transition d'une consommation contrôlée vers une consommation excessive et compulsive, rappelant le 3ème critère diagnostique du DSM-IV pour la dépendance. Ce phénomène a été historiquement décrit tout d'abord chez le rât, pour la cocaïne (Ahmed and Koob, 1998) puis reproduit pour l'héroïne (Ahmed et al., 2000) et la metamphetamine (Reichel et al., 2011). A l'heure actuelle, une telle escalade des prises d'opiacés n'a pas encore été publiée chez la souris à notre connaissance. Enfin, un modèle élaboré d'auto-administration a été proposé (Deroche-Gamonet et al., 2004), permettant de modéliser plusieurs critères du DSM-IV : critère 4 (exécution du comportement opérant, alors que la drogue n'est pas disponible, *no-drug period*) ; critère 5 (augmentation de la motivation à consommer la substance, reflétée par une augmentation du *break-point* dans une procédure de ratio progressif) et critère 7 (poursuite du comportement de consommation malgré l'association de la substance avec des chocs électriques, *resistance to punishment*). Dans ce modèle, les animaux considérés comme remplissant le plus grand nombre de critères présentent une propension plus importante à augmenter leur consommation et à rechuter après une période d'abstinence. Très récemment, ces 3 critères ont été modélisés chez la souris en utilisant un paradigme d'auto-administration orale de morphine (Berger and Whistler, 2011). Ce dernier modèle est prometteur et pourrait permettre d'exploiter les outils génétiques élaborés disponibles dans cette espèce.

Notons enfin que le critère numéro 6 du DSM IV a été très peu modélisé chez le rongeur, probablement en partie parce qu'en milieu de laboratoire, les activités sociales, occupationnelles et de loisirs sont évidemment assez sommaires… L'arrivée de cages d'hébergement dites « intelligentes » (IntelliCage By NewBehavior, TSE systems) pourrait permettre d'aborder cette thématique dans des conditions plus éthologiques.

b) Théories de l'addiction

De nombreuses théories ont été développées pour tenter d'appréhender l'addiction. La très grande majorité de ces théories se focalise sur le rôle des neurones dopaminergiques de la **voie mésocorticolimbique**. Ces neurones, originaires de l'aire tegmentale ventrale (VTA), envoient notamment de nombreuses projections vers le striatum, le cortex préfrontal, l'amygdale étendue, ou encore l'hypothalamus latéral. La voie mésocorticolimbique a longtemps été considérée comme le substrat neurobiologique du plaisir. En situation physiologique, ce système permet le renforcement positif de comportements essentiels à la survie, en associant un caractère plaisant aux activités de prises alimentaire et dipsique, d'interaction sociale ou aux comportements de reproduction (Wise and Rompre, 1989). Cette vision historique est maintenant clairement nuancée et complétée. Ainsi, ce système intervient également dans les processus motivationnels orientant les comportements vers la recherche de stimuli préalablement associés à une expérience hédonique (Palmiter, 2008) ainsi que dans la prédiction ou l'anticipation d'évènements plaisants (Schultz et al., 1997).

De nombreux auteurs ont cherché des adaptations biochimiques ou moléculaires communes aux différentes drogues d'abus. L'exemple classique est celui de la théorie unitaire, selon laquelle les drogues d'abus induisent toutes lors d'une administration aiguë une augmentation de la libération de dopamine dans le noyau accumbens (Wise, 1998). Leur consommation chronique induit également dans la voie mésolimbique (et dans d'autres régions cérébrales) une plasticité neuronale, notion vague recouvrant différents types d'adaptations. En modèle animal, on décrit par exemple des adaptations synaptiques fonctionnelles et structurales (Jones and Bonci, 2005), correspondant respectivement à une potentialisation synaptique à long-terme (LTP) dans la VTA (Kauer and Malenka, 2007) et des modifications de la densité synaptique dans le noyau accumbens (Russo et al., 2010). A l'échelle cellulaire, se produisent des modifications transcriptionnelles (Ammon-Treiber and Hollt, 2005; Nestler, 2001; Przewlocki, 2004) à long terme, comme l'accumulation du facteur de transcription ΔfosB dans le noyau accumbens (Nestler, 2005). Ces mécanismes aboutiraient à des modifications structurales et fonctionnelles macroscopiques accessibles chez l'homme à l'imagerie (Barrett et al., 2004; Shi et al., 2008; Vollstadt-Klein et al., 2010). Notamment, ces adaptations induiraient un dysfonctionnement de la transmission dopaminergique et joueraient un rôle majeur dans les comportements addictifs en étant impliqués dans plusieurs fonctions cérébrales, comme résumé dans la figure 10.

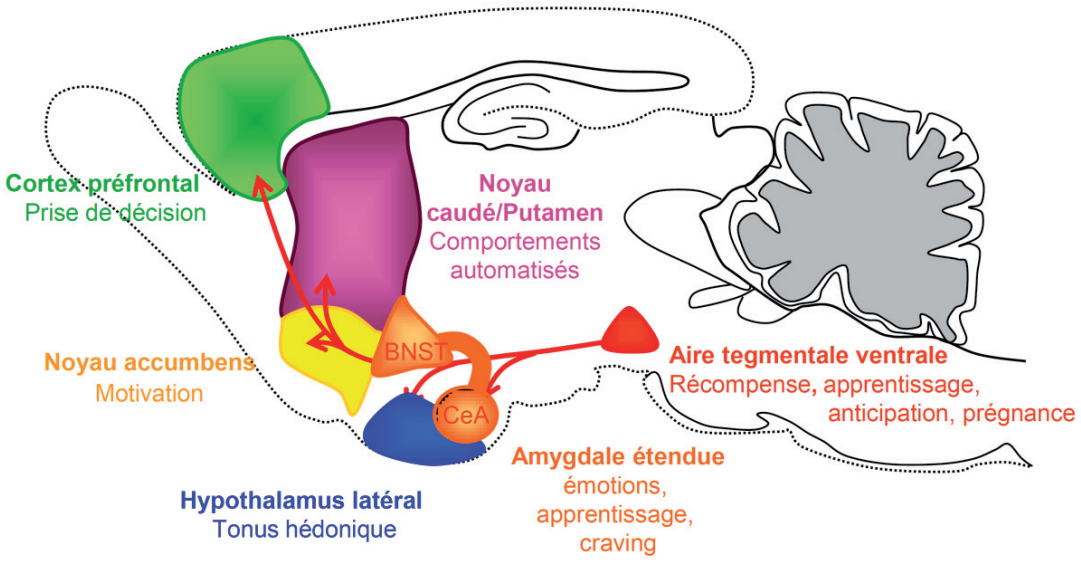


Figure 10. Voie dopaminergique mésocorticolimbique chez la souris. Représentation schématique en coupe sagittale des principales projections des neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale, avec leurs implications respectives dans certains processus cérébraux affectés chez les patients dépendants de substances psychoactives (figure : B. Kieffer).

Dans notre perspective de la comorbidité, la régulation de la fonction hédonique de ce système mésocorticolimbique suggère son implication dans l'anhédonie, symptôme majeur du trouble dépressif (Nestler and Carlezon, 2006). Par exemple, CREB (pour *cAMP responsive element*), un facteur de transcription, est particulièrement intéressant et a été beaucoup étudié en modèles animaux. L'exposition répétée et chronique à la morphine induit dans le noyau accumbens (NAc) une hyperactivité de la voie de l'adénosine monophosphate (AMPc), responsable d'une activation de la PKA, une protéine kinase qui entre autres phosphoryle et active CREB (Nestler and Aghajanian, 1997). Or, CREB est impliqué dans la régulation de l'humeur. Ainsi, une augmentation de l'activité de CREB induit une augmentation de l'immobilité dans le test de la nage forcée (Pliakas et al., 2001) et une diminution de la préférence pour le sucrose (Barrot et al., 2002), deux comportements apparentés à la dépression chez le rongeur. De plus, les effets de CREB semblent dépendre en partie d'un peptide opioïde endogène, la dynorphine ; ce peptide cible le récepteur kappa, un des 3 récepteurs opioïdes (voir paragraphe précédent). Les agonistes pour le récepteur opioïde kappa induisent tout comme CREB une augmentation de l'immobilité dans le test de la nage forcée (Mague et al., 2003) et un comportement apparenté à l'anhédonie (augmentation du seuil d'autostimulation intracrânienne ; (Todtenkopf et al., 2004)), ainsi qu'un effet dysphorique chez l'homme (Shippenberg et al., 2007) . Leur effet pourrait mettre en jeu, dans le NAc (Newton et al., 2002), une inhibition des neurones dopaminergiques induite par l'activation des récepteurs présynaptiques kappa exprimés par les neurones dopaminergiques dans cette structure (voir figure 11). Cet effet s'opposerait ainsi à celui de l'activation du récepteur mu qui entraîne une activation de ces neurones. Les prises répétées de morphine induisent une augmentation persistante à long terme de l'expression de la dynorphin dans le

noyau accumbens (Turchan et al., 1997) et le craving pourrait s'associer à une expression particulièrement forte de ce peptide opioïde.

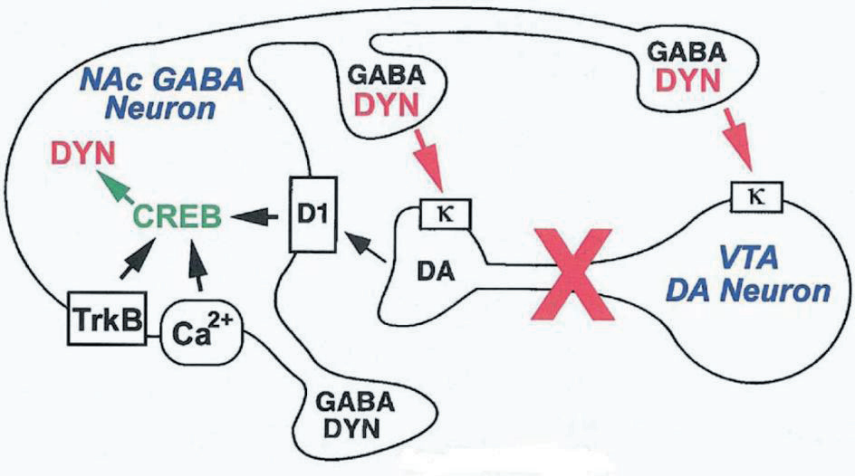


Figure 11. Dépression et voie méso-limbique. Inhibition des neurones dopaminergiques de la voie mésolimbique lors de l'exposition chronique aux opiacés, par activation de CREB et augmentation de l'expression de la dynorphine. NAc, noyau accumbens ; κ, récepteur opioïde kappa; DA, dopamine ; DYN, dynorphine ; D1, récepteur dopaminergique D1; Ca^{2+}, ions calciques ; CREB, c*AMP responsive element ;* TrkB*, Tyrosine-related kinase B*, le récepteur du *brain-derived neurotrophic factor*, BDNF (Nestler and Carlezon, 2006).

Ces données suggèrent ainsi que CREB et la dynorphine pourraient être impliqués dans l'apparition d'un épisode dépressif chez l'homme suite à une dépendance aux opiacés (voir chapitre VI, expérience 3). Elles suggèrent enfin l'utilisation d'antagonistes du récepteur kappa dans la prise en charge de la toxicomanie (Shippenberg et al., 2007) et en particulier dans la prévention de la rechute liée au stress (McLaughlin et al., 2003).

Outre ces théories « moléculaires », la psychologie expérimentale propose également une série d'hypothèses importantes. Nous résumerons très rapidement les plus significatives, en nous basant sur le travail de synthèse remarquable publié récemment par Badiani et al (Badiani et al., 2011). Tout d'abord, la théorie des **apprentissages aberrants** postule que l'exposition répétée aux drogues d'abus potentialise les réponses comportementales pavloviennes ou instrumentales induites par les « indices » associés à la prise de drogue (*drug-associated cues*) (Di Chiara, 1999; Hyman, 2005). Cette potentialisation pourrait se produire dans plusieurs régions cérébrales (striatum ventral et dorsal) et serait insensible à la dévaluation des effets positifs de la drogue, signalant un comportement devenant non contrôlé, c'est-à-dire compulsif. Ces processus pourraient dépendre d'un transfert du striatum ventral vers le striatum dorsal du contrôle de la prise de drogue, qui serait dépendant de la transmission dopaminergique (Belin et al., 2009). Il en résulte la poursuite des comportements de recherche et de consommation des produits, malgré leurs conséquences négatives, souvent

particulièrement lourdes dans le cas des opiacés, comme nous l'avons déjà souligné. En modèle animal (auto-administration, voir plus loin), la dévaluation de l'effet renforçant d'une drogue peut être induite en associant à la prise de drogue une punition comme un choc électrique.

Une autre théorie, de **dysfonctionnement cognitif fronto-striatal**, considère que l'exposition aux drogues d'abus entraine une perturbation des fonctions exécutives, se traduisant par la perte du contrôle des comportements impulsifs (contrôles inhibiteurs descendants, exercés par le cortex sur les structures sous-corticales, dits « top-down ») et des processus aberrants de prise de décision (Jentsch and Taylor, 1999). Ces anomalies contribueraient *in fine* à la prise compulsive de drogue, le patient étant dans l'incapacité de prendre une décision éclairée par les conséquences négatives liées à la poursuite des consommations.

La théorie de l'**allostasie hédonique** (Koob and Le Moal, 2001; Koob and Le Moal, 2008) est quant à elle directement lié à la théorie des processus opposants (Solomon and Corbit, 1973), selon laquelle une modification d'un état émotionnel ou hédonique (dans notre cas induit par les effets aigus d'une drogue d'abus) déclenche des adaptations neuronales qui vont contrecarrer ces effets et permettre le rétablissement de l'état d'équilibre du sujet, dans un processus homéostatique. Le comportement de consommation de la drogue est initialement sous le contrôle de son effet de récompense (*rewarding*), mais déclenche également des processus opposants anti-récompense (*anti-reward systems*), dont des systèmes liés au stress comme le CRF (Koob, 2008) ou le récepteur opioïde kappa (voir chapitre VI). La répétition de ces processus homéostatiques aboutit à un nouvel état émotionnel ou hédonique « allostatique », correspondant à un changement chronique dans l'état d'équilibre du système de récompense.

Mentionnons également la théorie de la **sensibilisation motivationnelle**. Cette théorie repose sur le postulat que toutes les drogues d'abus activent la transmission dopaminergique au sein du système mésocorticolimbique, dont le rôle serait d'encoder les propriétés motivationnelles de tout type de stimuli. L'exposition répétée à la drogue entrainerait une sensibilisation de ce système, qui ainsi réagirait plus fortement à la drogue et aux indices associés. Selon Robinson & Berridge, cette sensibilisation motivationnelle (*wanting*) se produirait indépendamment des effets de la drogue sur les systèmes neuronaux responsables de ses effets plaisants (*liking*) (Robinson and Berridge, 1993; Robinson and Berridge, 2001).

Enfin, la théorie de **la sensibilisation psychomotrice** considère qu'une propriété commune aux drogues d'abus est d'induire une activation psychomotrice (Wise and Bozarth, 1987). Tous les renforçateurs positifs, qui par définition favorisent la répétition du comportement associé à l'effet renforçant, activeraient les mécanismes neurobiologiques responsables des comportements d'approche (Glickman and Schiff, 1967). A nouveau, c'est la voie mésolimbique qui serait le substrat principal des comportements d'approche et de la sensibilisation psychomotrice. Cette théorie est critiquée pour sa relevance clinique : les opiacés ont peu d'effets psychostimulants chez l'homme et la répétition des usages induit une tolérance aux propriétés euphorisantes de la drogue plutôt qu'une sensibilisation. Néanmoins elle continue de nourrir la recherche dans le champ des addictions. En particulier en France le groupe de J.P. Tassin a décortiqué les interactions et le découplage entre

systèmes monoaminergiques sous-tendant la sensibilisation locomotrice aux drogues d'abus, et leur persistance à long terme (Tassin, 2008).

3. Physiopathologie de la dépression

Nous débuterons par une description des modèles animaux les plus utilisés dans l'étude de la dépression, puis nous détaillerons les hypothèses physiopathologiques fondamentales. Nous focaliserons notre exposé sur l'implication du système sérotoninergique, que nous avons abondamment étudié dans notre modèle de troubles dépressifs survenant lors de l'abstinence aux opiacés (voir chapitre V et VI).

a) Modèles animaux de dépression

Lorsque des rongeurs sont exposés à une situation de stress incontrôlable apparaissent des réactions comportementales considérées comme des comportements de résignation traduisant un état émotionnel de « type dépressif » (Cryan and Holmes, 2005). Les dispositifs expérimentaux validés permettant d'évaluer ces comportements de résignation sont notamment le test de la nage forcée et de la suspension caudale, qui comme leurs noms l'indiquent, consistent à placer les animaux dans un bécher d'eau ou à les suspendre par la queue, respectivement. Le test de la **nage forcée** a été développé chez le rat (Porsolt et al., 1978) puis rapidement adapté avec succès à la souris (Porsolt et al., 1977). La **suspension caudale** a été initialement développée chez la souris (Steru et al., 1985). Les deux tests engagent l'exposition à un stress incontrôlable auquel les animaux essayent de se soustraire. Ceci se traduit par des comportements actifs et volontaires d'escalade des parois dans le test de la nage forcée et de débattement dans la suspension caudale, qui font place au bout de quelques minutes à des périodes d'immobilité, qui constituent le comportement de résignation proprement dit. La validité de ces tests découle de leur sensibilité aux antidépresseurs efficaces en clinique : ils diminuent significativement la durée du comportement passif et favorisent les comportements actifs orientés vers la fuite. Ces tests s'avèrent ainsi extrêmement utiles pour le criblage de propriétés antidépressives de nouvelles molécules. Ils souffrent néanmoins de l'existence de faux positifs, comme les psychostimulants ou les agonistes dopaminergiques, qui induisent une hyperactivité locomotrice et une diminution de l'immobilité. En raison de leur sensibilité aiguë aux antidépresseurs, qui contraste avec la durée de traitement nécessaire pour obtenir un effet thérapeutique chez l'homme, et de la complexité affective et cognitive de la pathologie, leur validité en tant que modèle de dépression est discutable (Cryan and Holmes, 2005; Cryan et al., 2005). De nombreuses études montrent pourtant que ces deux tests possèdent une bonne validité prédictive en raison de leur sensibilité aux antidépresseurs suite à un traitement chronique également et à certains facteurs de risques génétiques et environnementaux de dépression chez l'homme. Nous citerons à titre d'exemples le modèle de **stress chronique léger et imprévisible** (SCLI, (Katz et al., 1981;

Willner et al., 1987)) et le gène du transporteur de la sérotonine. Le transporteur de la sérotonine (SERT pour *serotonin reuptake inhibitor*) est la protéine responsable de la recapture synaptique de la sérotonine. Elle constitue la cible moléculaire des antidépresseurs de la famille des ISRS (voir chapitre II). Un polymorphisme pour le promoteur de ce gène a été décrit (Caspi et al., 2003), pour lequel l'allèle « court » induit une augmentation du risque de dépression lors d'évènements de vie stressants par rapport à l'allèle « long » et se traduit par une activité de transcription du gène correspondant plus faible. En parallèle, la délétion de ce gène chez la souris entraîne une augmentation de l'immobilité dans le test de suspension caudale (Perona et al., 2008).

D'autre modèles murins de dépression sont très utilisés : la « mise en échec social » chronique (*chronic social defeat,* CSD, voir (Berton et al., 2006)), la « suppression de la prise alimentaire induite par la nouveauté » (*novelty-suppressed feeding,* voir plus loin), qui est un modèle mixte d'anxiété et de dépression. Ces 2 modèles présentent l'avantage de n'être sensible qu'à un traitement antidépresseur chronique. Citons également un modèle développemental, de séparation maternelle (Hofer, 1970).

b) Embryogénèse du système sérotoninergique

Les neurones du système sérotoninergique sont rassemblés au sein du tronc cérébral dans une série de groupes cellualires, numérotés de B1 à B9 selon la classification histochimique de Dahlstroem et Fuxe (Dahlstroem and Fuxe, 1964). Lors des jours 9,5 à 12 du développement embryonnaire (E9,5 à E12), ces neurones naissent dans la partie ventrale du rhombencéphale (rhombomères r1 à r8). Au cours de ces quelques jours, l'acquisition du phénotype sérotoninergique se fait d'abord pour les neurones r1, puis progressivement jusqu'à r8, par le jeu d'un réseau complexe de facteurs de transcriptions (Lmx1b et le très étudié Pet1, notamment) qui commandent l'expression des gènes clés de la biosynthèse de la sérotonine (Tph2, Aadc et Sert essentiellement, voir plus loin et (Gaspar et al., 2003)). Puis jusque vers la fin de la 3ème semaine de vie post-natale (P21), ces neurones migrent pour former les groupes de neurones sérotoninergiques B1 à B9, que l'on peut regrouper sur le plan histologique en noyaux, notamment les noyaux du raphé dorsal (DRN) et médian (MRN) (voir figure 12). Au cours de cette période, ces neurones vont également développer une arborisation dendritique, envoyer des projections axonales et former des connections synaptiques (Deneris and Wyler, 2012)).

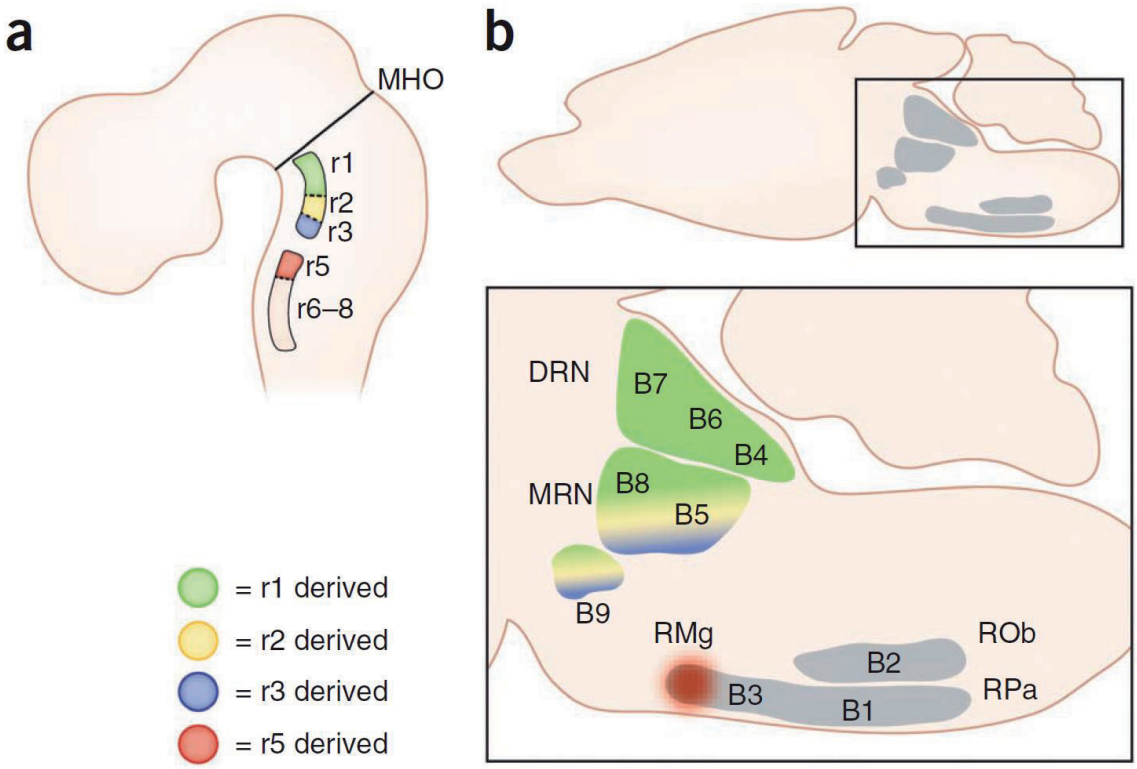


Figure 12. Embryogénèse du système sérotoninergique. (a) Les neurones sérotoninergiques apparaissent par division de progéniteurs neuronaux localisés dans les rhombomères r1 à r8. (b) Puis ces neurones migrent et forment les différents noyaux du raphé chez l'animal adulte. DRN, noyau du raphé dorsal ; MRN, noyau du raphé médian ; RMg, raphe magnus ; ROb, raphe obscurus ; RPa, raphe pallidus (Deneris and Wyler, 2012).

Les neurones localisés dans les noyaux du raphé dorsal et médian envoient des projections axonales rostrales vers les structures diencéphaliques et télencéphaliques, et sont donc les noyaux qui nous intéressent dans la suite de ce travail. A l'inverse, les neurones sérotoninergiques localisés dans les autres noyaux du raphé (raphé pallidus RPa, raphé obscurus Rob et raphé magnus RMg) projettent caudalement vers le tronc cérébral et la moelle épinière. Ces neurones ont été impliqués dans les contrôles nociceptifs descendants, et ne seront pas décrits ici davantage.

Les mécanismes de différenciation embryonnaire et de maturation du système sérotoninergique sont également impliqués dans le fonctionnement du système nerveux central chez l'animal adulte. Ainsi, des données récentes indiquent que les facteurs de transcription déterminant le phénotype neuronal sérotoninergique restent exprimés chez la souris adulte, et participent de la régulation émotionnelle (Liu et al., 2011). Chez le primate, un niveau d'expression faible du gène homologue à Pet-1 (Fev) a été retrouvé chez les individus sensibles à un stress chronique (Lima et al., 2009). Enfin, un très beau travail a récemment démontré qu'un traitement antidépresseur induit une trans-différenciation de neurones noradrénergiques en neurones sérotoninergiques, sous le

contrôle d'un micro-ARN (miR) : miR-16 (Baudry et al., 2010). Cette trans-différenciation implique probablement ces facteurs de transcription.

Bien que constitués de quelques milliers de neurones seulement chez le rongeur, les noyaux du raphé constituent des structures hétérogènes. Ils comprennent des neurones sérotoninergiques, mais également des neurones synthétisant et libérant du GABA, de la dopamine, etc…(Michelsen et al., 2007). Les neurones sérotoninergiques peuvent être également distingués selon leur propriétés électrophysiologiques (Beck et al., 2004). Les neurones 5-HT provenant du raphé dorsal présentent :

- sur le plan morphologique, des axones fins et variqueux, par opposition aux axones épais, non variqueux des neurones du raphé médian (Hensler, 2006),
- un fort niveau d'expression de SERT (faible pour le raphé médian) (Brown and Molliver, 2000), ce qui en ferait une cible privilégiée des ISRS.

c) Sérotonine, traitement antidépresseur et neurogénèse hippocampique

Historiquement, la découverte fortuite à la fin des années 50 des propriétés antidépressives des inhibiteurs de la monoamine oxydase (iproniazid), puis des inhibiteurs tricycliques de la recapture des monoamines (imipramine), est à la base de « **l'hypothèse monoaminergique** » de la dépression. Dans la lignée de cette hypothèse, la recherche fondamentale s'est focalisée davantage depuis quelques années sur le système sérotoninergique, les ISRS restant le traitement de première intention dans l'EDM. Il nous parait artificiel de dissocier l'étude des mécanismes d'action des ISRS de ceux de la dépression, étant donné ce contexte historique. De plus, nous avons utilisé dans notre modèle murin d'abstinence la FLX, un ISRS de référence. Pour ces raisons, les mécanismes d'action des ISRS feront ici l'objet d'une attention particulière.

La théorie monoaminergique (Berton and Nestler, 2006; Nutt, 2008) postule qu'une diminution chronique de l'activité des neurones correspondant (notamment sérotoninergiques ; Michelsen, 2008) contribue aux troubles dépressifs. Bien que les cibles pharmacologiques des antidépresseurs soient connues, les mécanismes responsables lors d'un traitement chronique de l'amélioration de l'humeur sont encore mal compris. La **neurogénèse hippocampique** et les facteurs neurotrophiques dans l'hippocampe font cependant partie des substrats ayant reçu la plus forte attention. Ramon Y Cajal, le grand neurophysiologiste espagnol du début du XXème siècle, considérait le cerveau humain comme immuable dans sa structure. On sait maintenant qu'au contraire, il possède d'étonnantes capacités plastiques, dépendant en particulier de l'apparition tout au long de la vie de nouveaux neurones. Cette neurogénèse ne se produit dans le cerveau de l'homme adulte que dans 2 régions: la zone sous-granulaire du gyrus denté de l'hippocampe et le bulbe olfactif. Parmi ces deux structures, l'hippocampe joue un rôle clé dans la régulation de l'axe HHS, la mémoire et le fonctionnement émotionnel, la désignant comme le probable substrat neurobiologique de certains symptômes dépressifs. La neurogénèse fait l'objet de nombreux travaux chez le rongeur quant à son rôle dans la régulation de l'humeur et les thérapies antidépressives. L'effet antidépresseur de l'enrichissement

environnemental serait ainsi dépendant de la neurogénèse hippocampique (Schloesser et al., 2010). En outre, Santarelli et al ont montré que l'irradiation par rayons X de l'hippocampe, qui abolit le potentiel neurogénique de cette structure, bloque la réponse comportementale à la FLX, chez des souris de fond génétique 129SvEv, dans le test de suppression de la prise alimentaire induite par la nouveauté (Santarelli et al., 2003). Des facteurs génétiques déterminent fortement la sensibilité à ce mécanisme d'action des antidépresseurs. Ainsi, les souris de souche Balb/cJ présentent une réponse à la FLX même en l'absence de neurogénèse hippocampique (Holick et al., 2008). Indépendamment de ces facteurs génétiques, les antidépresseurs peuvent agir via des mécanismes dépendants ou indépendants de la neurogénèse sur diverses modalités comportementales. Dans un modèle de troubles émotionnels induits par l'administration chronique de corticostérone (mimant une hyperactivité chronique de l'axe HHS), David et al ont montré que l'ablation par irradiation de la neurogénèse bloque les effets de la FLX dans certains tests (le test de suppression de la prise alimentaire induite par la nouveauté) mais pas dans d'autres (test du champ ouvert, test de la nage forcée) (David et al., 2009). La signification chez l'homme de ces résultats est actuellement très débattue (Sahay and Hen, 2007) mais les données d'imagerie montrent chez les sujets souffrant de dépression récurrente une diminution du volume de l'hippocampe (Campbell et al., 2004; Videbech and Ravnkilde, 2004), un effet qui pourrait faire intervenir une diminution de la neurogénèse hippocampique. Enfin, de par leur mécanisme d'action pharmacologique, les antidépresseurs impactent virtuellement l'ensemble du cerveau antérieur. Récemment par exemple, des neurones pyramidaux cortico-striataux ont été impliqués dans la réponse aux antidépresseurs ISRS (Schmidt et al., 2012).

Alors que les études en modèles animaux avaient surtout démontré l'implication de la neurogénèse dans le mécanisme d'action des antidépresseurs, une étude récente a montré que la diminution de la neurogénèse entraine chez la souris une perturbation de la régulation de l'axe HHS (Snyder et al., 2011), contribuant à l'apparition de comportements de type dépressif.

Enfin, le système opioïde régule la neurogénèse (voir aussi l'article 1). Un traitement morphinique chronique inhibe la neurogénèse chez le rat (Eisch et al., 2000; Kahn et al., 2005) et un effet similaire, bien que dépendant du mode d'administration, a été retrouvé chez la souris (Fischer et al., 2008). De façon cohérente, le KO du récepteur mu chez la souris induit une augmentation de la survie des neurones nouvellement formés dans le gyrus denté (Harburg et al., 2007) et des comportements de type dépressif (Filliol et al., 2000; Yoo et al., 2004). En définitive, l'ensemble de ces données suggère que l'exposition aux opiacés pourrait diminuer la neurogénèse hippocampique, un effet qui pourrait contribuer à la comorbidité opiacés/dépression.

d) Biosynthèse et métabolisme de la sérotonine

La sérotonine est synthétisée à partir du tryptophane (voir figure 13), un acide aminé essentiel, c'est-à-dire nécessaire dans l'alimentation chez l'homme. Dans le système nerveux central, l'isoforme 2 de la tryptophane hydroxylase (Tph2) (Walther et al., 2003) catalyse la première réaction

chimique produisant le 5-hydroxytryptophane (5-HTP) à partir du L-tryptophane. L'activité de cette enzyme détermine la quantité de sérotonine produite (*rate-limiting enzyme*). Puis le 5-HTP est transformé en sérotonine par décarboxylation, une réaction catalysée par les décarboxylases d'acides aminées (Aadc).

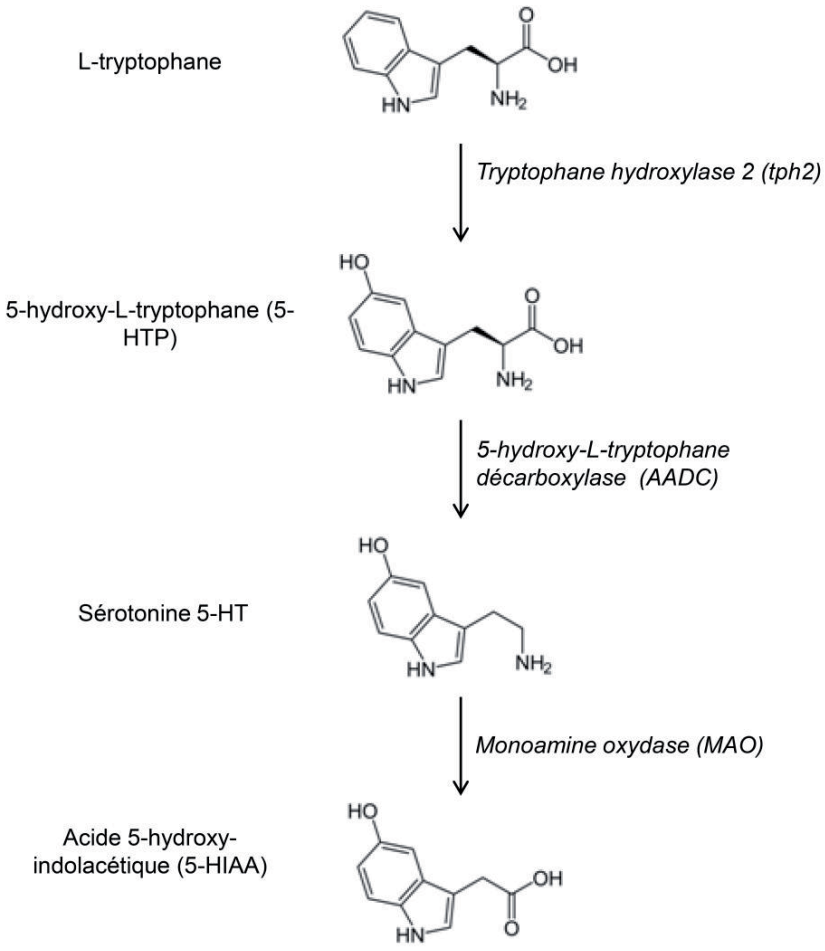


Figure 13. Biosynthèse et métabolisme de la sérotonine. La sérotonine est synthétisée à partir du tryptophane, un acide aminé essentiel, sous l'action successive de 2 enzymes : la tryptophane hydroxylase (tph2) puis une décarboxylase d'aminoacide (AADC). La sérotonine est métabolisée par les monoamines oxydases (MAO) en acide 5-hydroxy-indolacétique (5-HIAA).

L'hypothèse monoaminergique de la dépression implique que la diminution de l'activité des neurones sérotoninergiques se traduirait par une diminution des taux extracellulaires de ce neurotransmetteur dans différentes structures cérébrales et par une diminution de son métabolite (principalement le 5-HIAA) dans le liquide céphalo-rachidien ou le sang, participant ainsi de la symptomatologie dépressive. La portée clinique de cette hypothèse reste limitée, et n'a pas permis

par exemple d'établir de marqueur biologique reproductible de dépression chez l'homme. Néanmoins, une méta-analyse des études cliniques de déplétion en monoamines (déplétion en sérotonine, par privation de L-tryptophane, mais aussi déplétion en noradrénaline) conforte le lien entre perturbation métabolique et humeur (Ruhe et al., 2007). Nous avons étudié dans notre modèle d'abstinence les effets d'un traitement morphinique chronique sur le métabolisme sérotoninergique (voir l'article 2).

e) Le récepteur 5-HT$_{1A}$ (5-HT$_{1A}$R)

La théorie monoaminergique (Berton and Nestler, 2006; Nutt, 2008) postule qu'une diminution chronique de l'activité des neurones correspondants (notamment sérotoninergiques ; (Michelsen et al., 2008)) contribue aux troubles dépressifs. Or cette activité est étroitement régulée par différents mécanismes, dont le plus étudié et probablement le plus important sur le plan physiologique dépend d'un récepteur à la sérotonine, le récepteur 5-HT$_{1A}$ (5-HT$_{1A}$R). Le 5-HT$_{1A}$R appartient à la superfamille des RCPG, comme les récepteurs aux opioïdes. L'activation de ce récepteur induit la liaison d'une protéine G de type G$_{i/o}$ et l'activation du même type de cascades intracellulaires que les récepteurs aux opioïdes (Pucadyil et al., 2005). Globalement l'activation du 5-HT$_{1A}$R induit donc une inhibition neuronale.

Le 5-HT$_{1A}$R est extrêmement conservé au cours de l'évolution phylogénétique et serait apparu il y a quelques 300 millions d'années (Pucadyil et al., 2005). Chez les mammifères, ce récepteur est exprimé :

- par les neurones sérotoninergiques dans leur compartiment somato-dendritique : cet autorécepteur est alors responsable dans les noyaux du raphé d'un rétrocontrôle négatif local contrôlant leur activité,

- par des neurones non sérotoninergiques ; on parle alors d'hétérorécepteur, dont la fonction dépend de la structure cérébrale où il est exprimé.

De nombreuses données de recherche fondamentale et clinique ainsi que l'imagerie fonctionnelle chez l'homme (Parsey et al., 2006) indiquent que le 5-HT$_{1A}$R est impliqué dans la régulation de l'humeur (Savitz et al., 2009) et de l'anxiété (Akimova et al., 2009). La buspirone, un agoniste du 5-HT$_{1A}$R, est utilisé comme anxiolytique, bien que peu fréquemment (Goodman, 2004).

Les modèles animaux apportent également des notions intéressantes sur ce récepteur. Certains ISRS, comme la FLX, induiraient suite à un traitement chronique uniquement une désensibilisation du 5-HT$_{1A}$R, une cinétique qui pourrait être impliquée dans leur classique effet thérapeutique retardé (Hensler, 2003). Très récemment, un autre mécanisme a été identifé, qui pourrait également être impliqué dans le mode d'action des ISRS : une boucle de rétrocontrôle positif dépendant du récepteur 5-HT$_{2B}$ dans le DRN (Diaz et al., 2012). Le KO du 5-HT$_{1A}$R chez la souris induit une diminution des comportements de résignation et une augmentation de comportements de type anxieux. Plus précisément, une récente étude a montré par une approche génétique élégante que la seule diminution constitutive du niveau d'expression de ce récepteur dans le DRN suffit à reproduire un phénotype analogue à celui du KO (Richardson-Jones et al., 2010). De façon surprenante, le 5-HT$_{1A}$R dont nous venons de voir le rôle majeur dans la régulation émotionnelle a été

très peu étudié suite à l'exposition aux opiacés en modèles animaux. Cette question prend notamment tout son sens dans le cadre de notre problématique de comorbidité. A notre connaissance, une seule étude chez l'animal mentionne incidemment une absence d'effet de prises répétées et volontaires d'héroïne chez le rat sur la fonction de ce récepteur (Sim-Selley et al., 2000). Pourtant, le KO du récepteur mu induit une augmentation de l'expression du 5-HT_{1A}R dans les cortex cingulaire et moteur et dans l'hypothalamus (Yoo et al., 2004). Se pose ainsi la question de l'effet d'une activation chronique du récepteur mu sur le 5-HT_{1A}R.

4. Le stress, facteur de risque de comorbidité

Le dictionnaire de médecine Flammarion reconnaît 2 sens au mot stress. Celui-ci désigne à la fois « toute tension ou agression s'exerçant contre l'organisme » ainsi que « la réponse ou réaction non spécifique de l'organisme à cette agression ». Le stress constitue ainsi dans un premier temps un mécanisme de défense, permettant la mobilisation de ressources nécessaires à l'adaptation aux conditions de l'environnement. Parmi les réactions de l'organisme aux évènements de vie stressants figurent évidemment l'activation de l'axe HHS et la libération d'adrénaline dans la circulation sanguine par les glandes surrénales. Mais lorsqu'il est excessif ou trop fréquent, le stress peut avoir des effets délétères et constituer un facteur étiologique des troubles de l'humeur (Goudemand, 2010), aussi bien que des conduites de dépendance (Jacobsen et al., 2001) ; ou encore, un facteur de rechute chez les patients abstinents des opiacés, notamment en potentialisant le craving (Kosten et al., 1986).

Une hyperactivité de l'axe HHS est classiquement décrite comme affectant certains patients dépressifs (Pariante and Lightman, 2008), et lors de l'abstinence aux opiacés en modèle animal (voir chapitre V, article 2). Ainsi, l'abstinence s'associe à une sensibilité accrue au stress (Blatchford et al., 2005) et à une activité anormale de l'axe HHS. Chez des patients abstinents depuis 10 à 15 jours d'une dépendance à l'héroïne, on retrouve une augmentation de la cortisolémie au cours de la nuit (Li et al., 2008). En cas de sevrage aigu, le taux plasmatique de cortisol est également augmenté mais il est diminué lors d'un TSO par méthadone (Zhang et al., 2008).

De nombreux travaux précliniques permettent de modéliser et d'appréhender les mécanismes neurobiologiques à l'œuvre. Ainsi chez le rat, des stress tels qu'une restriction alimentaire (Carroll et al., 2001) ou des chocs électriques (Shaham and Stewart, 1994) peuvent augmenter l'auto-administration d'héroïne. Contention, isolement social, agressions répétées par des congénères (Boyce-Rustay et al., 2008) potentialisent également les effets des drogues d'abus (pour une revue chez le rat, voir (Lu et al., 2003)). Plus récemment, le modèle de CSD a été popularisé par Nestler et collaborateurs (Berton et al., 2006). Dans ce modèle, l'animal stressé (l'intrus, *intruder*) est soumis de façon répétée à une interaction avec un congénère agressif (le résident, *residant*), au cours de laquelle il adopte une posture de soumission. La répétition de ces sessions induit chez la souris stressée un évitement social et une diminution de la préférence au sucrose, considérée comme un analogue de l'anhédonie chez l'homme. Ce dernier test repose sur la tendance naturelle des rongeurs à préférer une solution sucrée par rapport à de l'eau pure. On présente aux animaux 2 biberons

identiques contenant de l'eau ou de l'eau sucrée et on mesure leur préférence (en pourcentage de volumes de liquide consommés) pour la solution sucrée. L'intérêt de ce modèle tient au fait que cette diminution de la préférence au sucrose n'est sensible qu'à un traitement chronique par un antidépresseur, mimant leur effet retardé chez l'homme. De façon particulièrement intéressante, les animaux soumis dans un premier temps au CSD présentent une sensibilité augmentée à la PPC induite par la cocaïne. De plus, un polymorphisme (G196A, Val66Met) du gène du BDNF (un facteur neurotrophique très étudié pour son action positive sur l'humeur) détermine la sensibilité à un stress social chronique et l'intensité de la PPC pour la cocaïne (Krishnan et al., 2007). Le CSD constitue ainsi un modèle prometteur de comorbidité. A notre connaissance, les effets récompensants des opiacés n'ont pas encore été étudiés en lien avec ce modèle.

5. Le cerveau social

Le modèle d'abstinence aux opiacés que nous avons développé chez la souris se caractérise notamment par un retrait social robuste, retrouvé dans différentes conditions expérimentales (voir Résultats Expérimentaux). Pour cette raison, nous détaillons ici brièvement quelques notions de neurobiologie des comportements sociaux.

La santé mentale chez l'homme est fortement et étroitement déterminée par la vie sociale. De la naissance à l'âge adulte et au cours du vieillissement, un environnement social stable et soutenant est essentiel au développement et au bien-être. Par exemple la maltraitance infantile, une forme extrême d'environnement social délétère, est reconnue comme un déterminant majeur du pronostic psychopathologique tout au long de la vie (Gilbert et al., 2009). Au cours de ces dernières années, le champ des neurosciences sociales a connu des développements considérables qui ont permis de dresser une ébauche de cartographie des circuits neuronaux (amygdale, cortex préfrontal et cingulaire, hippocampe) et des systèmes de neurotransmission (oxytocine, vasopressine, monoamine oxydase) sous-tendant les différents aspects des comportements sociaux (pour une revue de la littérature, voir (Meyer-Lindenberg and Tost, 2012)).

En particulier, ces progrès rapides doivent beaucoup à l'établissement de modèles animaux. Nous citerons l'exemple de travaux canadiens. Liu et collaborateurs ont montré en 1997 chez le rat que la qualité des soins maternels (au cours des 10 premiers jours de vie) module chez la progéniture la programmation épigénétique du récepteur aux glucocorticoides (GR), un acteur majeur de la régulation de l'axe HHS et des réponses au stress (Francis et al., 1999; Liu et al., 1997; Weaver et al., 2004). Un processus similaire a ensuite été décrit chez l'homme, qui serait responsable d'un risque de dépression et de suicide accru (McGowan et al., 2009). Ainsi, la maltraitance infantile chez l'homme, et un comportement maternel déficient chez le rat, perturbent fortement les réponses au stress tout au long de la vie. Dans ces 2 espèces, ces effets impliquent le même mécanisme moléculaire (la méthylation de l'ADN du promoteur du gène du GR) agissant sur des loci homologues entre les 2 espèces. Ainsi, certains mécanismes d'adaptation au stress social précoce seraient conservés au

cours de l'évolution. Ces résultats doivent nous encourager à utiliser des modèles animaux dans l'étude des mécanismes neurobiologiques sous-tendant les comportements sociaux.

Dans le cadre de la problématique de notre travail de thèse, il est important de rappeler que le système opioïde est actuellement proposé comme un substrat majeur des troubles du comportement social. Notamment, il a été montré que la douleur physique et la douleur « sociale » (isolement, rejet, exclusion) mettent en jeu des processus communs, au moins en partie (Eisenberger, 2012; Panksepp, 2003). Nous avons résumé récemment les données expérimentales établissant les rôles spécifiques des récepteurs opioïdes dans la régulation des comportements sociaux chez le rongeur (voir l'article 1) et leurs implications pour la régulation de l'humeur.

6. L'abstinence aux opiacés chez le rongeur

La dépendance est une pathologie dynamique qui comprend une succession de phases : elle débute par l'initiation ou la prise de substance, suivie de la répétition des consommations, alternant avec des épisodes de sevrage (qui constituent un élément du diagnostic de dépendance selon le DSM-IV). Lorsque les symptômes physiques du sevrage se dissipent, on parlera d'abstinence. La phase d'abstinence est caractérisée par une sensibilité accrue au stress ou à l'exposition à des indices associés à la drogue (Goeders, 2003), facteurs déclenchant importants de la rechute et de la réinstauration de la consommation (Sinha, 2007).

Compte tenu de la complexité de cet état dynamique d'abstinence, sa modélisation chez l'animal est un défi considérable. Contrairement aux processus impliqués dans l'instauration de la dépendance, le sevrage ou même la rechute, l'abstinence fait partie des phases du « cycle de la dépendance » les moins étudiées, probablement en raison de son caractère latent. Les données expérimentales de modélisation animale d'une abstinence prolongée aux opiacés se sont focalisées essentiellement sur les modifications persistantes des fonctions de récompense et de motivation (parfois difficile à distinguer expérimentalement). Ainsi on retrouve chez le rongeur lors d'un sevrage spontané et prolongé aux opiacés:

- une augmentation des seuils d'autostimulation intracrânienne (Kenny et al., 2006), reflétant une diminution de son effet renforçant,
- une diminution de la motivation à obtenir dans un conditionnement opérant un renforçateur naturel (comme une solution sucrée ; (Zhang et al., 2007)). Cet effet persistait jusqu'à au moins dix jours de sevrage.

Le groupe d'Aston-Jones a également mis en évidence chez le rat, suite à une exposition continue à la morphine (par implantation sous-cutanée de gélules de morphine assurant une libération prolongée sur plusieurs jours) une augmentation persistante (à 2 et 5 semaines d'abstinence) de la PPC à la morphine (Harris and Aston-Jones, 2003) et en parallèle une diminution de la PPC pour la nourriture (Harris and Aston-Jones, 2007).

Toutefois, ces dysfonctionnements ne représentent qu'un aspect du syndrome d'abstinence et seules quelques études se sont intéressées aux effets du sevrage sur la régulation émotionnelle.

Celles-ci indiquent que chez le rat le niveau d'anxiété est soit inchangé (Grasing et al., 1996), soit augmenté (Castilho et al., 2008; Harris and Aston-Jones, 1993b) lors du sevrage. Au contraire chez la souris, celui-ci peut se traduire par une diminution d'anxiété (Buckman et al., 2009). Seules deux études évaluent l'état anxieux en condition d'abstinence prolongée: un niveau d'anxiété exagéré peut être révélé jusqu'à 2 semaines d'abstinence (Harris and Aston-Jones, 2001) en réponse à un stress (test d'enfouissement d'une sonde électrifiée) mais l'anxiété basale semble au contraire diminuée à 6 jours d'abstinence (labyrinthe en croix surélevé, (Peregud et al., 2008)). Ces résultats contradictoires dépendent probablement des protocoles d'induction de la dépendance, des méthodes d'évaluation de l'anxiété et de l'espèce de rongeur considérée, et soulignent les difficultés rencontrées pour établir un modèle préclinique de la comorbidité entre dépendance aux opiacés et troubles anxieux.

Les comportements apparentés à la dépression au cours de l'état abstinent ont également été peu caractérisés. Une diminution du comportement de résignation dans le test de la nage forcée est décrite après 1 à 2 jours de sevrage chez le rat (Anraku et al., 2001) et chez la souris « adolescente » (Hodgson et al., 2009). Au contraire, une augmentation a été mise en évidence après 3 à 6 jours (Anraku et al., 2001; Molina et al., 1994) chez le rat (qui pourrait persister jusqu'à 3 semaines suite à l'exposition à une dose de morphine importante ; (Grasing and Ghosh, 1998)) et après 9 jours chez la souris (Hodgson et al., 2009). Ces dernières données suggèrent une dynamique dans la perturbation émotionnelle associée au sevrage prolongé aux opiacés chez le rongeur et ce travail a notamment été conçu dans cette perspective.

En particulier, l'ensemble des données que nous avons développé dans cette brève revue de la littérature suggère que les effets à long terme d'un traitement opiacé chronique sur l'activité des neurones monoaminergiques, et en particulier sérotoninergiques, pourrait avoir des effets sur la régulation émotionnelle et l'humeur. Les systèmes aminergiques, particulièrement dopaminergique et noradrénergique, participent à l'instauration de la dépendance ainsi qu'au sevrage aux opiacés. Les récepteurs mu sont exprimés :

- dans le locus coeruleus, par les neurones noradrénergiques,
- dans les noyaux du raphé (on distingue les noyaux du raphé médian et du raphé dorsal, NRM et NRD, respectivement ; (Jolas and Aghajanian, 1997)) et dans la VTA (Wise, 2004) et la « queue » (*tail*) de la VTA (tVTA, voir (Jalabert et al., 2011)), par des interneurones inhibiteurs (GABAergiques) ciblant les neurones de projections sérotoninergiques et dopaminergiques dans chacune de ces régions, respectivement.

L'administration systémique de morphine induit ainsi une activation du récepteur mu dans ces régions, laquelle sera responsable d'une inhibition des neurones noradrénergiques et d'une désinhibition des voies (ascendantes et descendantes) sérotoninergiques et dopaminergiques. Confirmant cette circuiterie, les neurones dopaminergiques mésocorticolimbiques sont classiquement activés par la morphine (et les autres drogues d'abus) et lors de l'instauration de la dépendance (Wise et al., 1995). Ils montrent une activité diminuée lors du sevrage après administration chronique de morphine (Diana et al., 1995). Néanmoins l'activité des neurones dopaminergiques ne contrôlerait pas directement l'expression des symptômes somatiques et comportementaux du sevrage (Caille et al., 2003a). D'autre part, les neurones noradrénergiques centraux sont essentiels (Maldonado, 1997) aux

processus de récompense (neurones du tractus solitaire ; (Olson et al., 2006)), et aux symptômes somatiques (locus coeruleus) et motivationnels (noyaux A1 et A2 qui projettent sur l'amygdale étendue) du sevrage (Aston-Jones and Harris, 2004; Delfs et al., 2000). Ainsi la clonidine, un agoniste des récepteurs α2, diminue chez le rongeur les symptômes somatiques et motivationnels du sevrage (Caille et al., 1999) ; elle est utilisée en clinique dans le traitement du sevrage opiacé.

Le rôle de la sérotonine (5-HT) a suscité moins d'attention dans ces processus. Les neurones sérotoninergiques des noyaux du raphé ne seraient pas indispensables pour l'établissement des propriétés renforçantes de la morphine (Zhao et al., 2007) ni dans les modifications des symptômes somatiques ou de l'état motivationnel accompagnant le sevrage (Caille et al., 2002; Caille et al., 2003b).

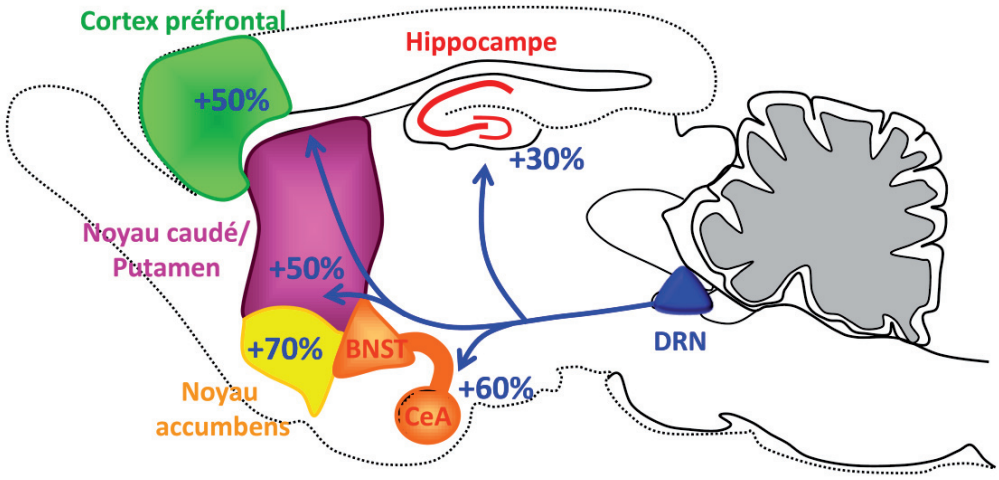


Figure 14. Effets de l'injection systémique de morphine (10 mg/kg, voie sous-cutanée) sur les taux extracellulaires de sérotonine dans le cerveau antérieur chez le rat (Tao and Auerbach, 1995).

Pourtant, il a été montré chez le rat (Grauer et al., 1992; Tao and Auerbach, 1995; Tao and Auerbach, 2002b) que l'injection systémique de morphine augmente considérablement la libération de sérotonine dans de nombreuses structures du cerveau antérieur innervées par le DRN (figure 14). Cet effet est bloqué et reproduit, respectivement, par l'infusion locale dans le DRN d'un antagoniste (Tao and Auerbach, 2002b) ou d'un agoniste (Tao and Auerbach, 1995) du récepteur mu. Au contraire, l'activation du récepteur mu dans le MRN n'a pas d'effet sur la libération de sérotonine, au moins chez le rat. Notons enfin que l'amplitude de l'effet de l'injection systémique de morphine sur la libération de sérotonine est très variable selon les structures du cerveau antérieur considérées, suggérant que le récepteur mu présente une expression non homogène sur les interneurones GABAergiques locaux contrôllant les différents groupes de neurones sérotoninergiques. Lors de l'auto-administration de morphine également, une libération de 5-HT accompagne les premières prises au niveau du cortex cingulaire antérieur (Sudakov et al., 2007). De même chez la souris de souche C57BL/6J, l'injection systémique de morphine augmente la

libération de sérotonine dans le noyau accumbens (+75% environ, voir (Fadda et al., 2005)) et le striatum dorsal (+50% environ), avec des amplitudes très similaires. Notons enfin que chez la souris de souche DBA/2J, la morphine diminue (-30% environ, (2005)) la libération de 5-HT dans le striatum ventral, suggérant que des facteurs génétiques régulent fortement le contrôle exercé par le système opioïde sur la transmission sérotoninergique. Ainsi, même si nous n'excluons pas la participation de récepteurs mu exprimés dans des structures projettant vers le DRN, ces données suggèrent que ces effets systémiques des opiacés dépendent très majoritairement du récepteur mu exprimé localement dans le DRN. Nous testons actuellement l'implication de cette population de récepteurs dans notre modèle d'abstinence à l'héroïne (chapitre VI, expérience 5).

Comme pour la transmission dopaminergique, suite à une activation morphinique prolongée, le sevrage s'accompagne d'une diminution de l'activité des neurones sérotoninergiques. Cet effet serait dû notamment à une hyperactivité de l'adénylate cyclase (correspondant à un mécanisme compensatoire secondaire à l'inhibition répétée de cette enzyme par le traitement morphinique chronique ; (Jolas et al., 2000)) se traduisant notamment par une diminution des taux de 5-HT dans plusieurs régions cérébrales (Tao et al., 1998). Enfin, une potentialisation de la transmission sérotoninergique est capable chez le rat de contrecarrer les effets de l'abstinence de la morphine : les propriétés récompensantes exagérées de la morphine lors de l'abstinence que nous avons déjà évoquées sont contrecarrées par une injection du précurseur de la sérotonine (5-HTP), ou une injection aiguë d'un ISRS (Harris and Aston-Jones, 2001). De plus, l'administration d'un ISRS avant un sevrage précipité, diminue les symptômes physiques de sevrage (Akaoka and Aston-Jones, 1993; Gray, 2002; Wu et al., 2005). Son administration subchronique, conjointement à la morphine, réduit également les symptômes physiques (Gray, 2002; Singh et al., 2003) et motivationnels (Rafieian-Kopaei et al., 1995) du sevrage. Ainsi, sans pour autant être nécessaire à l'établissement d'une dépendance physique, la transmission sérotoninergique peut significativement modifier les anomalies comportementales associées au sevrage ou à l'abstinence et influencer ceux-ci, et sa potentialisation apparaît bénéfique sur ces anomalies.

ARTICLE 1

Opioid receptors: distinct roles in mood disorders.

Lutz PE, Kieffer BL.

Trends in Neurosciences (invited review, submitted).

Abstract

The roles of opioid receptors in pain and addiction have been extensively studied, but their function in mood disorders has received less attention. Accumulating evidence from animal research reveal that mu, delta and kappa opioid receptors exert highly distinct controls over mood-related processes. Delta agonists and kappa antagonists have promising antidepressant potential, whereas implication of mu receptors in mood control is more complex and benefits of mu receptor targeting in the clinic remain an open question. At present, both human and animal studies have mainly implicated mu receptors in the etiology of depressive disorders, and future studies will address delta and kappa receptor function in both established and emerging neurobiological aspects of depression, including neurogenesis, neurodevelopment and social behaviors.

Introduction

The opioid system is best studied in pain and drug abuse research. Endogenous opioids and their receptors were discovered from the early use of opium in both medicinal and recreational practices. Morphine, the most active ingredient of opium, has highly potent pain-relieving properties and remains the most widely used painkiller in modern medicine, despite a plethora of undesirable effects. Among these, abuse liability remains a limitation when undertaking opioid-based therapies to treat pain. Heroin, the diacetylated morphine derivative has even stronger addictive properties and, as a major illicit drug of abuse, represents a public health problem worldwide. The remarkable ability of opiates to reduce both physical and psychic pain has prompted scientists to identify neural basis of these activities.

Opiate drugs hijack a complex neuromodulatory system composed of three receptors, mu, delta and kappa (Box 1), which interact with a family of endogenous opioid peptides known as enkephalins, dynorphins and β-endorphin. Both receptors and peptides are expressed throughout peripheral and central nervous systems [1], and have been the subject of intense investigations for several decades (for recent reviews see [2, 3]). Opioids play a central role in pain processing [4, 5] and regulate many other aspects of physiology that include stress responses, respiration, gastrointestinal transit, as well as endocrine and immune functions (see [6, 7]). The mood-regulating properties of endogenous opioids represent another main aspect of opioid physiology. The potent euphoric effects of known opiate drugs, and the high density of peptides and receptors in limbic brain areas, set the opioid system as a central player in both reward processing and mood control (see Glossary), and a feasible target to treat emotional dysfunction [8].

Mood disorders are defined as a group of diagnoses where mood disturbance is the main underlying feature. Among these, major depressive disorder (MDD) is a chronic relapsing disorder characterized by the repetition of major depressive episodes (MDE, see Glossary). The natural course of a depressive episode is remission (50% at one year), even in the absence of medical intervention. Unfortunately, 80% patients experience relapse within 15 years [9]. Depression is a worldwide leading cause of disability, expected to even worsen during next decades [10]. In the early 1900's, an opioid cure was proposed for the treatment of depressed patients, through progressive exposure to low doses of an opiate mixture. Although seemingly effective [11], this approach was hampered by the inherent

addictive properties of available opiates, as is the case for pain treatment. Since the advent of monoamine systems targeting drugs in the 50's, the antidepressant utility of opiates was not further considered and, first line treatments in modern medicine rely on selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs). SSRIs however are effective in only 40-50% patients, and identifying new targets for therapeutic intervention stands as a major challenge.

Today, opioids are re-entering the therapeutic arsenal for MDD treatment. Agonists such as buprenorphine are used in the specific context of refractory depression [12] and depression-addiction comorbidity [13], and may have broader indications. Recent clinical and animal research data further strengthen the notion that endogenous opioids contribute to the etiology of mood disorders, notably major depressive disorders. Here we will review both genetic and pharmacological approaches that reveal mu, delta and kappa opioid receptors as highly distinct players in reward processes and emotional responses, and very different targets for clinical intervention in MDD. The role of endogenous opioids has been partly reviewed elsewhere [14], and will only be briefly mentioned when appropriate.

Opioid receptor knockout studies in behavioral models of reward and mood disorders.

Knockout mice for mu, delta and kappa opioid receptors (see [15]) have been created almost two decades ago [16] and have been characterized on many aspects. Reward processes [17] and mood states [18], which both involve hedonic responses, have been examined in opioid receptor mutant mice mainly in the context of addiction. Phenotypes that were detected in relevant behavioral models (see Glossary) are summarized in Figure 1 (see also references [19-32]).

Data from mu receptor knockout mice concur to establish that this receptor represents a key molecular player for reward processing of both natural and artificial stimuli. This robust activity contributes to recreational drug use and facilitates the onset of addictive behaviors [33]. The strong rewarding effect of mu agonists likely contributes to the reported success of the 'opioid depression cure' [34]. Besides, two groups reported decreased anxiety- and depressive-like behaviors in mu knockout mice, indicating the possibility of a paradoxical prodepressant role of mu receptors in regulating emotional responses [35, 36]. Mu receptor-mediated mechanisms of mood control may therefore be more complex than previously anticipated, a notion that is supported by the pharmacology (see below).

Whether delta receptors regulate reward processes is less clear (see [37]). Morphine place preference was decreased in delta knockout mice [38, 39], but morphine self-administration was preserved [39, 40], suggesting that delta receptors contribute to contextual learning rather than opioid reward. Importantly, genetic deletion of delta receptors led to a robust increase in anxiety and depressive-like behaviors [35], a phenotype that was not found in kappa (no phenotype) receptor knockout mice, and partly recapitulated in preproenkephalin knockout mice [41]. Further studies largely confirmed mood-enhancing activity of the enkephalin/delta receptor system [37]. Voluntary alcohol drinking was increased in delta knockout mice [42], strengthening the view that, in contrast to mu receptors, delta receptors are not necessary for drug reward. Intriguingly, innate high anxiety levels of mutant mice were reduced after alcohol self-administration [42], in favor of the self-medication hypothesis [43] and further supporting the prominent role of delta receptors in reducing emotional responses.

In addiction research, dynorphin/kappa receptor is definitely considered a major anti-reward system opposing mu receptor activity [44, 45]. Knockout data are consistent with the view that the dynorphin/kappa receptor system tonically decreases reward, although this not detectable for all drugs of abuse (Figure 1). In addition, the notion that kappa receptor/dynorphin activity is increased by several stressors including social defeat or drug-seeking situations, and is associated with stress-induced psychopathology is now well-established [46, 47]. Accordingly enhanced cocaine seeking, triggered by stressful conditions (repeated social defeats or repeated forced swim) in wild-type mice, is not detectable in mutant mice presumably due to lack of dynorphin/kappa receptor-mediated dysphoric state [48-50]. Because of the importance of stress to recruit kappa systems it is not surprising that, in contrast to delta knockout mice, kappa knockout mice did not differ from control mice in classical behavioral models of anxiety and depressive-like behaviors involving limited stress [35].

Altogether, current knowledge clearly indicates that all three opioid receptors differentially regulate reward processes and emotional responses, which reveals highly distinct receptor type-specific mechanisms.

Antidepressant potential for mu, delta and kappa drugs

Pharmacological data (Table 1) demonstrate effects of opioid drugs in rodent models of depression (see Box 2 for definitions). Historically, Kastin et al showed antidepressant-like effects of enkephalins and endorphins in the FS in rats [51]. Inhibitors of enkephalinase [52], and the general opioid antagonist naloxone [53], were later found to have antidepressant- and depressant-like effects in the LH model, respectively. These results indicated that endogenous opioid peptides regulate despair-like behavior and further studies using selective mu, delta and kappa drugs revealed specific roles for each opioid receptor in these effects.

The antidepressant-like activity of delta receptor agonists is most documented. Coherent with increased depressive-like behaviors in delta knockout mice (Figure 1), studies have shown that delta receptor activation by several agonists has antidepressant-like effects across three behavioral paradigms (LH [53, 54], CSM [55], FS [56-70], TS [71] and olfactory bulbectomy [69]) in two species (rat & mouse).

Similar to delta, but less documented, acute pharmacological activation of the mu receptor consistently reduces depressive-like behaviors in the LH in rat [53, 72, 73] and in the TS or FS in mice [60, 74, 75]. Pharmacological antidepressant-like effects of mu agonists are in apparent contradiction with the decreased depressive-like behaviors observed in mu knockout mice (Figure 1). There are several possibilities to explain this apparent discrepancy. First, constitutive mu receptor knockout mice may have developed a compensatory high mood state. Second, mu opioid receptor expression may be dynamically regulated during brain development, and mu-dependent signaling may show both positive and negative effects across maturation stages towards adulthood. Third, acute and chronic or excessive mu opioid receptor activation may have pro- and antidepressive-like effects, respectively.

At present, kappa receptor pharmacology has mainly been examined in the context of dysphoric states associated to addiction, using combined genetic and pharmacological approaches (see Figure 1 and above). Only two studies have shown effects of kappa drugs in classical rodent models of

depression. The agonist U69493 [76] and four antagonists (ANTI, GNTI, JDTic and nor-BNI [76-78]) showed depressant and antidepressant-like effects, respectively, in the FS and LH in rats. It is likely that future studies will further confirm beneficial effects of kappa antagonists on disrupted mood states, in a number of animal models of depression involving chronic stress (see Glossary).

In conclusion, delta agonists and kappa antagonists have promising antidepressant potential, and both delta and kappa drugs are under development. In contrast, data from mu receptor analysis are more complex, and benefits of mu receptor targeting in the clinic remains an open question.

Opioid receptors and the neurobiology of depression

Many neurotransmitter systems and brain sites mediate the emergence of depressive symptoms and mechanisms underlying the neurobiology of depression include dysregulation of monoaminergic systems, hippocampal neurogenesis and neurotrophic factor function, to name a few (see detailed reviews elsewhere [79, 80]). Opioid peptides and receptors have been involved in all these aspects.

Opioid & monoaminergic systems: overlapping anatomy & functional interactions. Neuromodulatory monoaminergic systems are composed of neurons synthesizing mainly dopamine (DA), nordrenaline (NA) and serotonin (5-HT). These neurons originate in the brainstem, send axonal projections throughout the whole brain and are tightly controlled at multiple sites by the endogenous opioid system (Figure 2).

The DA mesolimbic system regulates hedonic homeostasis and, as such, contributes to mood disorders [81]. At cellular level, kappa receptors have been shown located on presynaptic terminals of DA neurons in the NAc (Figure 2 and [82]). Local overexpression of the transcription factor CREB in NAc increased both dynorphin-kappa signaling and depressive-like behaviors [83], directly correlating kappa receptor-mediated inhibition of DA release to lowered mood. Within this line, local infusion of nor-BNI (kappa antagonist) within the NAc mimicked antidepressant-like effect of systemic kappa receptor blockade using the LH paradigm in rats [77, 84]. Enkephalin release in DA pathways is also involved. The encounter of an unfamiliar congener triggers detectable release of the opioid peptide in the rat NAc [85], an effect that may mediate social reward, at least in part. Further, this enkephalin release was lost in anhedonic chronically stressed rats (see Glossary and [85]), suggesting that a low enkephalin tone in the NAc associates with stress-induced anhedonia. Chronic treatment with amilsulpiride, a dopamine D2 receptor antagonist, potentiated antidepressant-like effects of delta receptor activation[86], suggesting antagonistic functions of D2 and delta opioid receptors in mood control. Finally, in addiction research, countless evidence documents the activation of DA neurons by mu receptor activation in the VTA [87]. Data also indicate that activation of mu and delta receptors regulate DA release in the NAc, with distinct effects across various sub-nuclei of the NAc [88]. Although much is known about the complex DA/opioid interaction in addictive behaviors, further studies are needed to fully understand impact of the DA/opioid interplay in mood disorders.

The monoamine theory of depression posits that decreased activity of either 5-HT or NA neurons underlies depressive disorders [80]. Pharmacological studies show that the combination of sub-

effective doses of codeine, a weak mu agonist, with a SSRI is behaviorally effective in the TS test [75] and that effects of two tricyclic antidepressants in the FS are antagonized by the general opioid antagonist naloxone [89], establishing interactions between 5-HT/NA and opioid systems.

Mu opioid receptors tightly control the activity of 5-HT neurons. Systemic acute morphine injection increases 5-HT release in various limbic regions in rats [90] and mice [91], an effect antagonized or mimicked by infusion into the dorsal raphe nucleus (DRN) of a mu antagonist [92] or agonist [90] respectively. Morphine seemed to act only on 5-HT neurons originating from the DRN, as infusion in the MRN had no effect on forebrain 5-HT release [93]. Similar to DA neurons (Figure 2), morphine is proposed to activate 5-HT neurons through a disinhibition mechanism, with local GABAergic interneurons in the DRN expressing the mu opioid receptor [92]. Chronic morphine had opposing effects and led to a compensatory up-regulation of the GABAergic tone on 5-HT neurons, resulting in decreased 5-HT activity upon cessation of chronic treatment and during withdrawal [94].

Long-term effects of chronic morphine on mood have only been investigated recently in rodents. Depressive-like behaviors were detectable in acute withdrawal from chronic morphine treatment in rat [95, 96], and after more prolonged withdrawal, or protracted abstinence, in rat [97] and mouse [98, 99]. Interestingly, the latter mouse study showed that behavioral deficits progressively strengthen during morphine abstinence, and peak after 4 weeks [99]. Importantly, these emotional deficits were reversed by chronic SSRI-treatment during the withdrawal period. In this mouse model of opiate abstinence, chronic morphine induced sequential signaling adaptations at the level of the 5-HT1A receptor [100], the main autoreceptor controlling 5-HT neurons activity, that transiently desensitized during morphine abstinence. This molecular adaptation was previously identified in several rodent models of depression [100-102]. Finally, mice lacking most central 5-HT neurons [103] showed normal morphine conditioned place preference (CPP, see Glossary), a finding that suggests an interesting anatomical dissociation whereby 5-HT neurons are not implicated in mu receptor-dependent reward, but mediate mu receptor-regulation of affective states. 5-HT neurons activity is also regulated by kappa and delta receptors [104], and the former has received much attention. An elegant study showed that kappa-induced aversion anatomically relies on 5-HT neurons innervating the NAc [105], suggesting that depressant activity of the kappa receptor/dynorphin system arises from a complex interplay between 5-HT and DA systems.

Finally, NA neurons are also sensitive to endogenous opioidergic modulation. In contrast with 5-HT and DA neurons, NA neurons express the mu opioid receptor. Thus, acute morphine injection increased 5-HT and DA release, but decreased NA release in the forebrain [106]. Following chronic opiate treatment, rebound from this inhibitory effect produced hyperactivity of the NA system. In particular, hyperactivity of NA neurons targeting the Bed Nucleus of the Stria Terminalis (BNST) was shown to mediate aversive signs of acute opiate withdrawal [107], and may also be implicated in altered rewarding properties of natural stimuli (food) in opiate abstinence [108]. To our knowledge, there is no report on long-term consequences of mu-mediated adaptations in NA system on emotional responses.

Altogether, these data indicate that opioid receptors exert multiple controls over the three main monoaminergic systems in rodents. Research in the addiction field suggests that repeated exposure to drugs of abuse disrupt mutual inhibitory feedback mechanisms between monoaminergic nuclei, inducing

long-term adaptations at the behavioral level [109]. Whether such mechanisms also impair mood, possibly through opioid receptors, is an intriguing hypothesis.

Neurogenesis & cell fate specification. In the hippocampus, synaptic plasticity and neurogenesis (restricted to the sub-granular zone of the dentate gyrus) are two forms of plasticity implicated in both depression pathogenesis and effects of antidepressant drugs. Life stress events are thought to decrease dendritic length, dendritic arborization or spine density [110, 111], or to decrease neurogenesis [112] while antidepressants reverse these effects [111, 113] and mu opioid receptors modulate both aspects. Chronic morphine self-administration decreased dendritic spines density in hippocampal CA1 and dentate gyrus up to one month after termination of drug consumption [114]. Also, a seminal report indicated that chronic but not acute treatment with morphine decreases both neuronal proliferation and survival in the hippocampus of adult rats [115]. This finding was replicated in rat & mouse [116], although data are variable according to dose, regimen and duration of treatment, and mu knockout mice exhibited increased proliferation [117, 118]. Chronic treatment of adult hippocampal progenitors cultured in-vitro with the mu receptor antagonist β-funaltrexamine increased neuronal differentiation, suggesting that endogenous opioid peptides targeting mu receptors tonically inhibit neurogenesis. Together these results suggest that repeated mu receptor signaling decreases structural plasticity and neurogenesis in the hippocampus.

The neurotrophic factor BDNF is a most studied molecular substrate of hippocampal synaptic adaptations and neurogenesis. Genetic ablation of TrkB, the BDNF receptor, in hippocampal neural progenitors impaired neurogenesis [119] and the BDNF/TrkB system was shown to mediate proper spine density in the hippocampus [120], and to regulate depressive-like responses [121]. Interestingly, opioid receptor activation regulates BDNF activity. Systemic administration of peptidic [70] and non-peptidic [122] delta agonists showed antidepressant-like effects in rats and increased BDNF mRNA broadly in the brain, including in the hippocampus. Also, hippocampal endogenous opioids (enkephalins) up-regulated BDNF mRNA in naltrindole (delta) and naltrexone (mu-specific dose) reversible manners [123], suggesting that both receptors control expression of this major neurotrophic factor. Whether opioid-induced reduced synaptic density and increased BDNF expression in the hippocampus are relevant to mood dysfunction remains to be determined.

In-vivo and in-vitro evidence also support a regulatory role for mu and delta receptors in gliogenesis. Chronic morphine treatment increased immunoreactivity for GFAP (a marker of astrocytes) in the hippocampus [124]. *In vitro*, chronic treatment of adult hippocampal progenitors with specific mu (β-funaltrexamine) and delta (naltrindole) receptor antagonists decreased their differentiation into both astrocytes and oligodendrocytes (RIP), while favoring neuronal fate [125], while the kappa antagonist nor-BNI had no effect. Overall, these results suggest that both mu and delta opioid receptors may regulate engagement into either neuronal or glial lineage in the rodent hippocampus. Interestingly, a recent report [126] showed that social isolation, a major risk factor for depression, favors glial over neuronal cell fate. It is therefore possible that the opioid system, known to mediate social stimuli and involved in social isolation (see below), contributes to mood disruption via dysregulation of hippocampal cell fate specification.

Neurodevelopment. Clinicians have long recognized depression as a brain disorder with deep developmental roots. Brain maturation, from birth through adolescence, is a dynamic process during which genetic and environmental factors shape emotional circuits to establish personality and affective traits [127, 128]. In rodents, similar to morphine exposure in adulthood, in-utero treatment impaired hippocampal structure [129], an adaptation that may contribute to the development of depressive-like behaviors in adulthood. Indeed, perinatal morphine exposure increased depressive-like behaviors at early adolescent and adult ages [130]. In a translational perspective, activation of opioid receptors during brain development may also have life-long consequences in humans. Offspring from mothers that were dependent to opiates during gestation exhibit significantly elevated anxiety, aggression and rejection [131], although the respective contributions of environmental factors and in-utero heroin exposure in this case is debated [132].

Social life, opioids and mood disorders. Social hedonic capacity is a major determinant of emotional well-being in humans [133], and social stressors provide preclinical research with ethologically relevant models of depression [79]. In rodents, social interactions act as natural reinforcers and are partly mediated by the opioid system [134]. In particular, social isolation was shown to activate brain circuits partly overlapping with nociceptive circuits in several species, and “social pain” [135] is attenuated through stimulation of mu receptors [136]. Within this line, activation of the mu opioid receptor in adolescents mice decreased social isolation-induced exploration of a familiar congener [137]. In addition to social isolation, chronic social defeat (CSD, see Glossary) is a social stressor known to induce anhedonia and depressive-like behaviors. Surprisingly, social avoidance induced by CSD was attenuated in mu knockout mice [138]. Together, these results suggest that an endogenous opioid tone targeting the mu receptor is regulated as a function of social stimuli, and that both decrease (social isolation) and increase (social defeat) of this mu opioid tone have detrimental consequences on mood, possibly through differential neuronal mechanisms. Similarly in humans, the mu opioid receptor gene A118G polymorphism, whose functional relevance is debated [139], is associated with increased social hedonic capacity [140] but greater reactivity to social rejection [141]. The kappa opioid receptor also regulates social behaviors and associated depressive-like behaviors. The kappa antagonist Nor-BNI partly prevented defeated postures induced by social stress [49] in rat, while kappa signaling within the NAc mediates to rejection of social conspecifics, thus maintaining pair bonds in the monogamous prairie vole [142].

Social behaviors show a striking developmental pattern, with specific behaviors (such as play) occurring in restricted time windows, and opioid receptors regulate some of these maturation stages. Male rats exposed to morphine in-utero exhibited increased pinning (a measure of play behavior) and social grooming [143] at juvenile age, in addition to increased sociability and decreased social avoidance at adult age [144], indicating that early opiate exposure may have life-long stimulating effects on social behaviors. A groundbreaking study revealed that mu KO mice pups show decreased vocalization when separated from their mothers [145] and single nucleotide polymorphism in the mu receptor gene correlated with the quality of parental attachment in infant-primates (C77G, [146]) and

humans (A118G, see [147]), further demonstrating that the mu opioid receptor mediates maternal attachment across species. In rats, the quality of maternal care during the first week of life strongly influenced stress responses and the risk for stress-related disorders such as depression throughout adulthood [148]. Finally, several reports indicate that the quality of maternal care has long-term effects on the opioid system. Maternally separated (see Glossary) rats showed increased physical signs of morphine withdrawal [149] and decreased sensitivity to morphine anti-nociceptive effect [150] that correlated with changes in mu opioid receptor binding in pain-related brain structures [151]. Possibly therefore, adaptations of mu receptor signaling as a function of maternal care have life-long implications for the regulation of mood.

Later in life, social interactions with peers fulfill an important adaptive role during adolescence [152], promoting encounters with individuals outside the natal group and independence from this group. Social play is rewarding in adolescent rats (for a review, see [153]) and induces place preference in adolescent mice [154] and rats [155] Endogenous opioid peptide release was detected throughout the brain during social behaviors in adolescent rodents [156, 157] and mu and kappa agonists increased and decreased social play, respectively [158].

Altogether the setting of proper social and affiliative behaviors during development [159] and throughout life [133] has crucial adaptive value for affective regulation, and it is very likely that opioid-mediated regulation of social behaviors has life-long impact on vulnerability to depression. At present, there is strong evidence that mu receptors contribute to social reward, but the potential implication of kappa receptors in social behaviors remains poorly explored and delta receptors have not yet been examined in this context.

Opioid receptors and depression in human

Epidemiology: comorbidity and the opioid system. Epidemiology studies have long shown that comorbidity, or the co-occurrence of two diseases in the same individual, is extremely frequent in psychiatry. In particular, the association between depression and addiction is one of the most classical comorbidity cluster [160]. According to the self-medication hypothesis, depressed patients take advantage of acute euphoric properties of drugs of abuse to overcome depressed mood, a transient relief that bears its own risk of entering into dependence [43]. Conversely, it has been suggested that drugs of abuse triggers neuroadaptations in brain structures, such as the mesolimbic DA pathway, that contribute to mood homeostasis. Repeated exposure to drugs could impair these mechanisms, leading to depressive disorders (substance-induced depressive disorder). Numerous animal data now convincingly document both hypothesis [161], and the relationship between addiction and depression is undoubtedly bidirectional. As demonstrated in this review, the opioid system is a central player in both disorders, and thus a likely major contributor to comorbidity. While acute mu activation has euphoric and antidepressant-like effects in rodents (self-medication), chronic and intermittent mu signaling appears as a major risk factor for depression (substance-induced depressive disorder) [98, 99]. Interestingly, opiate addicts under opiate maintenance therapy still present a high risk of major depressive disorder, suggesting that allostatic changes may have developed beyond the sole mu receptor. Thus, combining mu agonism (for maintenance therapy) with either kappa antagonist or delta agonist activities seems

particularly suited to treat patients suffering from both opiate dependence and depression, and some clinical results using buprenorphine are encouraging (see [13]).

Post-mortem and imaging studies: insight into the human disorder. Post-mortem autoradiographic studies examined mu opioid receptor binding in suicide victims mainly diagnosed with depression. Mu receptor expression was increased in frontal and temporal cortex [162-164], as well as in caudate nuclei [163] suggesting that depression and suicide associate with higher mu density.

Advances in functional neuroimaging allow studying mu opioid receptors in patients experiencing various mood states. Positron emission tomography with the mu selective radiotracer [^{11}C]-carfentanil was used in healthy women during neutral and sadness states [165]. Compared to neutral state, the sadness state was characterized by increased binding potential (BP) for the radiotracer, interpreted as a decrease in mu neurotransmission, in the rostral anterior cingulate, ventral pallidum, amygdala, and inferior temporal cortex. In the future, development of PET ligands with delta and kappa selectivity should allow similar studies for the two other opioid receptors (for example, see http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00939887?term=kappa&rank=2).

A similar approach was applied to women diagnosed with major depressive disorders [166]. During the neutral state differences were already detectable, with depressed patients showing decreased mu BP in the posterior thalamus compared to controls. Together these data suggest that acute (sadness state) and chronic (MDD) negative emotional states associate with opposing activities of mu receptors, reminiscent of rodent data comparing acute pharmacological stimulation versus constitutive genetic ablation of the mu opioid receptor. Further, the later study [166] showed increased mu BP in the rostral anterior cingulate in healthy controls under sadness condition but not in depressed patients, and decreased mu BP in the left inferior temporal cortex of depressed women, highlighting the importance of circuitry analysis in comparing emotional reactivity across physiological and pathological conditions. Of note is that confronting human post-mortem or imaging findings with rodent data is currently difficult, since human studies mainly address cortical areas whereas rodent studies classically focus on subcortical areas. More extensive mapping will be required in both species to improve translational research.

Conclusion

As behavioral models in rodents get more sophisticated, and neurobiological mechanisms of mood disorders better understood, mu, delta and kappa opioid receptors appear as important and very distinct players in emotional states. In brief, animal studies show that mu and kappa receptors oppositely regulate hedonic homeostasis, delta receptors improve mood states acutely, kappa receptors decrease mood after stress, and mu receptors exert contrasting effects on mood. Clinical trials are awaited to appreciate the benefits of delta agonist and kappa antagonist strategies to treat depressive disorders, while the risk-benefit balance of mu agonists as antidepressants remains difficult to evaluate, in addition to their obvious abuse liability. At present, research on causal factors underlying mood disorders has mainly implicated mu receptors in the etiology of depressive states. Future studies will address the yet

unknown roles of delta and kappa receptors in neurobiological aspects of major depressive disorders related to neurogenesis, neurodevelopment and social behaviors.

Box 1. Molecular aspects of opioid receptor function. Mu, delta and kappa opioid receptors form a subfamily of class A (rhodopsin-like) G protein coupled receptors (GPCRs), which also includes the homologous but non-opioid nociception/orphanin FQ receptor. GPCRs, also known as seven-transmembrane receptors, form the largest family of membrane receptor proteins encoded by the genome [167].

Receptor structure. The long-awaited high resolution crystal structure of mu [168], delta [169] and kappa [170] opioid receptors represents a breakthrough in opioid research [171]. In their ligand-bound inactive form, the three receptors share a conserved wide-open opioid binding pocket [169] contrasting with buried pockets of other GPCRs crystallized so far [168]. Mu receptors form intimate oligomeric pairs within the crystal [168], supporting the view that opioid receptors may function as homo or heterodimers, or even larger oligomers [172-174]. Structure-based approaches are now possible to develop novel drugs, and elucidation of opioid receptor activation mechanisms at atomic level is a feasible goal.

Receptor signaling. All three opioid receptors are coupled to inhibitory $G\alpha_{i/o}$ proteins, and their activation modifies ion channel activities or decreases cAMP levels. These events both lead to inhibit neuronal activity, and have been best studied. As for most GPCRs, opioid receptors also stimulate other G protein-independent signaling pathways, notably via b-arrestins [175]. Many effectors have been identified, and a main challenge is the identification of signaling pathways operating in vivo that control behavioral responses [2, 176].

Biased agonism. A current view is that opioid receptors, as for most GPCRs, exist under several active conformations. Distinct agonists therefore can form selective agonist/receptor complexes, which in turn engage distinct signaling and receptor regulatory responses, a phenomenon conceptualized as biased agonism in GPCR research [177-180]. The mu receptor was among first GPCRs showing biased agonism at the level of endocytic responses [181]. At present promises of biased agonism *in vivo* are emerging for all three mu [182-184], delta [37] and kappa [185] receptors (see [186]) to develop better analgesics with less abuse liability (mu), or drugs with for targeted and sustained efficacy in the treatment of mood disorders (delta and kappa).

Glossary

Anhedonia: a reward-related deficit [17] characterized by markedly diminished interest or pleasure in all, or almost all, activities.

Chronic mild stress (CMS): animals are subjected to a variety of unpredictable physical and social stressors [187], leading to anhedonia and despair-like behaviors.

Chronic social defeat (CSD): when exposed to resident aggressive congeners, rodents adopt a submissive characteristic posture [188]. Repeated social defeat episodes produce long-lasting social avoidance and anhedonia [189].

Conditioned suppression of motility (CSM): a close variant from the learned helplessness, except the animal cannot avoid footshocks [190].

Conditioned place preference/aversion (CPP/CPA): a pavlovian conditioning in which a drug is repeatedly paired with a set of environmental stimuli that progressively acquire motivational properties and then condition approach (CPP) or avoidance (CPA) behaviours upon re-exposure to these stimuli [191]. Classically used to measure rewarding properties of drug of abuse, and considered to depend on learning, motivational and hedonic mechanisms.

Forced swim (FS): rodents, placed in an inescapable container of water, adopt a floating, immobile behavior interpreted as despair [192].

Learned helplessness (LH): animals exposed to inescapable shocks subsequently fail to escape when able to [193].

Mood: a pervasive and sustained subjective emotional state that influences one's whole personality and perception of the world, with generally either a positive (mania) or negative (depression) valence; while an emotion tends to have a clear focus, mood tends to be diffuse.

Mood disorders: a group of diagnoses where disturbance in the person's mood is a main underlying feature. There are four groups of mood disorders in DSM-IV: (i) major depressive disorder (MDD), defined as the repetition of major depressive episodes (MDE, see below) (ii) dysthymic disorder: a long-lasting (2 years or more), less severe form of depression, (iii) bipolar disorder, alternation of manic and depressive episodes, (iv) cyclothymia, a milder form of bipolar disorder.

Major depressive episode (MDE): defined [18] by the presence of 5 (or more) following symptoms during a two-weeks period, with at least one of the first 2 symptoms): depressed mood, anhedonia, weight loss or gain, insomnia or hypersomnia, psychomotor agitation or retardation, fatigue or loss of energy, feelings of worthlessness or excessive or inappropriate guilt, diminished ability to think or

concentrate, indecisiveness, recurrent thoughts of death (not just fear of dying), recurrent suicidal ideation without a specific plan, or suicide attempt or a specific plan for committing suicide.

Maternal separation: animals separated from their mother during early postnatal life develop depressive-like behaviors [194].

Reward: a process that acutely reinforces behaviour, corresponding to the positive value ascribed to an object, behavioral act or internal physical state. Triggered by natural (eating, mating, social behaviours) or artificial (drugs of abuse) stimuli.

Social Interactions: a pair of animals is observed and scored for naturally occurring social behaviors [195].

Sucrose preference: rodents prefer drinking a sucrose solution over tap water. CMS decreases sucrose preference [196], an anhedonic phenotype.

Tail suspension: rodents, when hung from the tail, adopt an immobile posture interpreted as behavioral despair [197].

Outstanding questions:

1. **Opioid and mood beyond MDD.** In the future, it will be crucial to study how opioid receptors contribute to psychiatric disorders other than major depressive disorder that also involve mood disruption. For example, clinical data indicate that the opioid system is implicated in schizophrenia [198] or borderline personality disorder [199], two conditions involving dysregulation of emotional and reward processes. At present, however, animal models of bipolar or borderline personality disorders are poorly characterized [200], and animal data on the role of opioid receptors in affective dimensions of schizophrenia are missing. In addition, recent studies revealed enhanced motor impulsivity in mu knockout mice [201], suggesting that this receptor may also contribute to impulse control disorders. The latter finding opens the way to consider mu receptors in a variety of pathological conditions that, beyond drug abuse, include antisocial and borderline personality disorders, attention deficit hyperactivity disorder, pathological gambling, eating disorders and obsessive-compulsive disorder. Finally, the crucial role of the opioid system in parental attachment across species [141, 145, 146], social behaviors and social pain [135] may have implications for the understanding of autism spectrum disorders that have been linked to deficits in social motivation [202].

2. **Dynamics of opioid system adaptations.** A major challenge in the future will be to unravel dynamic adaptations of the endogenous opioid system, as mood disruption emerges and evolves. This question is of high clinical relevance, as many brain disorders implicating the opioid system are defined as chronic cyclic or relapsing diseases (addiction, MDD, chronic pain).

3. **Opioids and novel aspects in mood research.** Future studies will also address the potential implication of opioid receptors and peptides in newly identified pathophysiological mechanisms of depression, revealed for example by fast-acting antidepressant effects of NMDA receptor antagonists or 5-HT4 receptor agonists. Also, considering the immune theory of depression, the well-established immunomodulatory function of opioid receptors may have implications in mood control.

Acknowledgements

The authors would like to thank Sandra Bour for her help in figures preparation and Claire Gaveriaux-Ruff for critical reading of the manuscript.

References

1 Le Merrer, J.*, et al.* (2009) Reward processing by the opioid system in the brain. *Physiol Rev* 89, 1379-1412

2 Al-Hasani, R. and Bruchas, M.R. (2011) Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior. *Anesthesiology* 115, 1363-1381

3 Sauriyal, D.S.*, et al.* (2011) Extending pharmacological spectrum of opioids beyond analgesia: multifunctional aspects in different pathophysiological states. *Neuropeptides* 45, 175-188

4 Zollner, C. and Stein, C. (2007) Opioids. *Handb Exp Pharmacol*, 31-63

5 Dickenson, A.H. and Kieffer, B.L. (2005) Opiates: Basic mechanisms. In *Textbook of Pain* (5th edn) (McMahon, S.B. and Koltzenburg, M., eds), pp. 427-442, Elsevier

6 Bodnar, R.J. (2010) Endogenous opiates and behavior: 2009. *Peptides* 31, 2325-2359

7 Bodnar, R.J. (2011) Endogenous opiates and behavior: 2010. *Peptides* 32, 2522-2552

8 Berrocoso, E.*, et al.* (2009) Opiates as antidepressants. *Curr Pharm Des* 15, 1612-1622

9 Mueller, T.I.*, et al.* (1999) Recurrence after recovery from major depressive disorder during 15 years of observational follow-up. *Am J Psychiatry* 156, 1000-1006

10 Mathers, C.D. and Loncar, D. (2006) Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med* 3, e442

11 Kraepelin, E. (1901) Einführung in die psychiatrische klinik. *Ambrosius Barth-Verlag: Leipzig*

12 Machado-Vieira, R. and Zarate, C.A., Jr. Proof of concept trials in bipolar disorder and major depressive disorder: a translational perspective in the search for improved treatments. *Depress Anxiety* 28, 267-281

13 Gerra, G.*, et al.* (2004) Buprenorphine versus methadone for opioid dependence: predictor variables for treatment outcome. *Drug Alcohol Depend* 75, 37-45

14 Hegadoren, K.M.*, et al.* (2009) The role of beta-endorphin in the pathophysiology of major depression. *Neuropeptides* 43, 341-353

15 Gaveriaux-Ruff, C. and Kieffer, B.L. (2002) Opioid receptor genes inactivated in mice: the highlights. *Neuropeptides* 36, 62-71

16 Kieffer, B.L. (1999) Opioids: first lessons from knockout mice. *Trends Pharmacol Sci* 20, 19-26

17 Der-Avakian, A. and Markou, A. (2011) The neurobiology of anhedonia and other reward-related deficits. *Trends Neurosci*

18 American Psychiatric Association (1994) Diagnostic and statistical manual of mental disorders, fourth edition. *Washington, DC: American Psychiatric Association*

19 Berrendero, F.*, et al.* (2002) Attenuation of nicotine-induced antinociception, rewarding effects, and dependence in mu-opioid receptor knock-out mice. *J Neurosci* 22, 10935-10940

20 Contarino, A.*, et al.* (2002) Lack of reward and locomotor stimulation induced by heroin in mu-opioid receptor-deficient mice. *Eur J Pharmacol* 446, 103-109

21 Galeote, L.*, et al.* (2009) Prodynorphin gene disruption increases the sensitivity to nicotine self-administration in mice. *Int J Neuropsychopharmacol* 12, 615-625

22 Ghozland, S.*, et al.* (2002) Motivational effects of cannabinoids are mediated by mu-opioid and kappa-opioid receptors. *J Neurosci* 22, 1146-1154

23 Hall, F.S.*, et al.* (2004) mu-Opioid receptor knockout mice display reduced cocaine conditioned place preference but enhanced sensitization of cocaine-induced locomotion. *Brain Res Mol Brain Res* 121, 123-130

24 Hall, F.S.*, et al.* (2001) Ethanol consumption and reward are decreased in mu-opiate receptor knockout mice. *Psychopharmacology (Berl)* 154, 43-49

25 Kovacs, K.M.*, et al.* (2005) Decreased oral self-administration of alcohol in kappa-opioid receptor knock-out mice. *Alcohol Clin Exp Res* 29, 730-738

26 Matthes, H.W.*, et al.* (1996) Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature* 383, 819-823

27 Nguyen, A.T.*, et al.* (2012) The rewarding action of acute cocaine is reduced in beta-endorphin deficient but not in mu opioid receptor knockout mice. *Eur J Pharmacol*

28 Nguyen, A.T.*, et al.* (2012) The role of mu opioid receptors in psychomotor stimulation and conditioned place preference induced by morphine-6-glucuronide. *Eur J Pharmacol* 682, 86-91

29 Papaleo, F.*, et al.* (2007) Decreased motivation to eat in mu-opioid receptor-deficient mice. *Eur J Neurosci* 25, 3398-3405

30 Robledo, P.*, et al.* (2004) The rewarding properties of MDMA are preserved in mice lacking mu-opioid receptors. *Eur J Neurosci* 20, 853-858

31 Simonin, F.*, et al.* (1998) Disruption of the kappa-opioid receptor gene in mice enhances sensitivity to chemical visceral pain, impairs pharmacological actions of the selective kappa-agonist U-50,488H and attenuates morphine withdrawal. *EMBO J* 17, 886-897

32 Roberts, A.J.*, et al.* (2000) mu-Opioid receptor knockout mice do not self-administer alcohol. *J Pharmacol Exp Ther* 293, 1002-1008

33 Contet, C.*, et al.* (2004) Mu opioid receptor: a gateway to drug addiction. *Curr Opin Neurobiol* 14, 370-378

34 Tenore, P.L. (2008) Psychotherapeutic benefits of opioid agonist therapy. *J Addict Dis* 27, 49-65

35 Filliol, D.*, et al.* (2000) Mice deficient for delta- and mu-opioid receptors exhibit opposing alterations of emotional responses. *Nat Genet* 25, 195-200

36 Yoo, J.H.*, et al.* (2004) Altered emotional behaviors and the expression of 5-HT1A and M1 muscarinic receptors in micro-opioid receptor knockout mice. *Synapse* 54, 72-82

37 Pradhan, A.A.*, et al.* (2011) The delta opioid receptor: an evolving target for the treatment of brain disorders. *Trends Pharmacol Sci* 32, 581-590

38 Chefer, V.I. and Shippenberg, T.S. (2009) Augmentation of morphine-induced sensitization but reduction in morphine tolerance and reward in delta-opioid receptor knockout mice. *Neuropsychopharmacology* 34, 887-898

39 Le Merrer, J.*, et al.* (2010) Deletion of the delta Opioid Receptor Gene Impairs Place Conditioning But Preserves Morphine Reinforcement. *Biol Psychiatry*

40 David, V.*, et al.* (2008) Brain regional Fos expression elicited by the activation of mu- but not delta-opioid receptors of the ventral tegmental area: evidence for an implication of the ventral thalamus in opiate reward. *Neuropsychopharmacology* 33, 1746-1759

41 Konig, M.*, et al.* (1996) Pain responses, anxiety and aggression in mice deficient in pre-proenkephalin. *Nature* 383, 535-538

42 Roberts, A.J.*, et al.* (2001) Increased ethanol self-administration in delta-opioid receptor knockout mice. *Alcohol Clin Exp Res* 25, 1249-1256

43 Markou, A.*, et al.* (1998) Neurobiological similarities in depression and drug dependence: a self-medication hypothesis. *Neuropsychopharmacology* 18, 135-174

44 Bruijnzeel, A.W. (2009) kappa-Opioid receptor signaling and brain reward function. *Brain Res Rev* 62, 127-146

45 Koob, G.F. (2008) A role for brain stress systems in addiction. *Neuron* 59, 11-34

46 Bruchas, M.R.*, et al.* (2010) The dynorphin/kappa opioid system as a modulator of stress-induced and pro-addictive behaviors. *Brain Res* 1314, 44-55

47 Knoll, A.T. and Carlezon, W.A., Jr. (2010) Dynorphin, stress, and depression. *Brain Res* 1314, 56-73

48 McLaughlin, J.P.*, et al.* (2006) Prior activation of kappa opioid receptors by U50,488 mimics repeated forced swim stress to potentiate cocaine place preference conditioning. *Neuropsychopharmacology* 31, 787-794

49 McLaughlin, J.P.*, et al.* (2006) Social defeat stress-induced behavioral responses are mediated by the endogenous kappa opioid system. *Neuropsychopharmacology* 31, 1241-1248

50 Redila, V.A. and Chavkin, C. (2008) Stress-induced reinstatement of cocaine seeking is mediated by the kappa opioid system. *Psychopharmacology (Berl)* 200, 59-70

51 Kastin, A.J.*, et al.* (1978) Enkephalin and other peptides reduce passiveness. *Pharmacol Biochem Behav* 9, 515-519

52 Tejedor-Real, P.*, et al.* (1993) Effect of mixed (RB 38A) and selective (RB 38B) inhibitors of enkephalin degrading enzymes on a model of depression in the rat. *Biol Psychiatry* 34, 100-107

53 Tejedor-Real, P.*, et al.* (1995) Implication of endogenous opioid system in the learned helplessness model of depression. *Pharmacol Biochem Behav* 52, 145-152

54 Tejedor-Real, P.*, et al.* (1998) Involvement of delta-opioid receptors in the effects induced by endogenous enkephalins on learned helplessness model. *Eur J Pharmacol* 354, 1-7

55 Nieto, M.M.*, et al.* (2005) Physiological control of emotion-related behaviors by endogenous enkephalins involves essentially the delta opioid receptors. *Neuroscience* 135, 305-313

56 Saitoh, A.*, et al.* (2004) Potential anxiolytic and antidepressant-like activities of SNC80, a selective delta-opioid agonist, in behavioral models in rodents. *J Pharmacol Sci* 95, 374-380

57 Saitoh, A.*, et al.* (2011) The novel delta opioid receptor agonist KNT-127 produces antidepressant-like and antinociceptive effects in mice without producing convulsions. *Behav Brain Res* 223, 271-279

58 Noble, F.*, et al.* (2008) Use of preproenkephalin knockout mice and selective inhibitors of enkephalinases to investigate the role of enkephalins in various behaviours. *Psychopharmacology (Berl)* 196, 327-335

59 Vergura, R.*, et al.* (2008) Anxiolytic- and antidepressant-like activities of H-Dmt-Tic-NH-CH(CH2-COOH)-Bid (UFP-512), a novel selective delta opioid receptor agonist. *Peptides* 29, 93-103

60 Yang, Q.Z.*, et al.* (2011) The antidepressant-like effect of human opiorphin via opioid-dependent pathways in mice. *Neurosci Lett* 489, 131-135

61 Broom, D.C.*, et al.* (2002) Nonpeptidic delta-opioid receptor agonists reduce immobility in the forced swim assay in rats. *Neuropsychopharmacology* 26, 744-755

62 Broom, D.C.*, et al.* (2002) Convulsant activity of a non-peptidic delta-opioid receptor agonist is not required for its antidepressant-like effects in Sprague-Dawley rats. *Psychopharmacology (Berl)* 164, 42-48

63 Javelot, H.*, et al.* (2010) Human opiorphin is a naturally occurring antidepressant acting selectively on enkephalin-dependent delta-opioid pathways. *J Physiol Pharmacol* 61, 355-362

64 Jutkiewicz, E.M.*, et al.* (2004) Delta-opioid agonists: differential efficacy and potency of SNC80, its 3-OH (SNC86) and 3-desoxy (SNC162) derivatives in Sprague-Dawley rats. *J Pharmacol Exp Ther* 309, 173-181

65 Jutkiewicz, E.M.*, et al.* (2005) Differential behavioral tolerance to the delta-opioid agonist SNC80 ([(+)-4-[(alphaR)-alpha-[(2S,5R)-2,5-dimethyl-4-(2-propenyl)-1-piperazinyl]-(3-me thoxyphenyl)methyl]-N,N-diethylbenzamide) in Sprague-Dawley rats. *J Pharmacol Exp Ther* 315, 414-422

66 Jutkiewicz, E.M.*, et al.* (2005) Separation of the convulsions and antidepressant-like effects produced by the delta-opioid agonist SNC80 in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 182, 588-596

67 Jutkiewicz, E.M.*, et al.* (2003) Effects of the delta-opioid receptor agonist SNC80 on learning relative to its antidepressant-like effects in rats. *Behav Pharmacol* 14, 509-516

68 Jutkiewicz, E.M.*, et al.* (2006) Behavioral and neurobiological effects of the enkephalinase inhibitor RB101 relative to its antidepressant effects. *Eur J Pharmacol* 531, 151-159

69 Saitoh, A.*, et al.* (2008) Antidepressant-like effects of the delta-opioid receptor agonist SNC80 ([(+)-4-[(alphaR)-alpha-[(2S,5R)-2,5-dimethyl-4-(2-propenyl)-1-piperazinyl]-(3-me thoxyphenyl)methyl]-N,N-diethylbenzamide) in an olfactory bulbectomized rat model. *Brain Res* 1208, 160-169

70 Torregrossa, M.M.*, et al.* (2006) Peptidic delta opioid receptor agonists produce antidepressant-like effects in the forced swim test and regulate BDNF mRNA expression in rats. *Brain Res* 1069, 172-181

71 Naidu, P.S.*, et al.* (2007) NIH 11082 produces anti-depressant-like activity in the mouse tail-suspension test through a delta-opioid receptor mechanism of action. *Eur J Pharmacol* 566, 132-136

72 Besson, A.*, et al.* (1996) Effects of morphine, naloxone and their interaction in the learned-helplessness paradigm in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 123, 71-78

73 Rojas-Corrales, M.O.*, et al.* (2002) Antidepressant-like effects of tramadol and other central analgesics with activity on monoamines reuptake, in helpless rats. *Life Sci* 72, 143-152

74 Berrocoso, E.*, et al.* (2012) Active behaviours produced by antidepressants and opioids in the mouse tail suspension test. *Int J Neuropsychopharmacol*, 1-12

75 Berrocoso, E. and Mico, J.A. (2009) Cooperative opioid and serotonergic mechanisms generate superior antidepressant-like effects in a mice model of depression. *Int J Neuropsychopharmacol* 12, 1033-1044

76 Mague, S.D.*, et al.* (2003) Antidepressant-like effects of kappa-opioid receptor antagonists in the forced swim test in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 305, 323-330
77 Shirayama, Y.*, et al.* (2004) Stress increases dynorphin immunoreactivity in limbic brain regions and dynorphin antagonism produces antidepressant-like effects. *J Neurochem* 90, 1258-1268
78 Beardsley, P.M.*, et al.* (2005) Differential effects of the novel kappa opioid receptor antagonist, JDTic, on reinstatement of cocaine-seeking induced by footshock stressors vs cocaine primes and its antidepressant-like effects in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 183, 118-126
79 Krishnan, V. and Nestler, E.J. (2010) Linking molecules to mood: new insight into the biology of depression. *Am J Psychiatry* 167, 1305-1320
80 Belmaker, R.H. and Agam, G. (2008) Major depressive disorder. *N Engl J Med* 358, 55-68
81 Nestler, E.J. and Carlezon, W.A., Jr. (2006) The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biol Psychiatry* 59, 1151-1159
82 Svingos, A.L.*, et al.* (2001) Major coexpression of kappa-opioid receptors and the dopamine transporter in nucleus accumbens axonal profiles. *Synapse* 42, 185-192
83 Carlezon, W.A., Jr.*, et al.* (2009) Kappa-opioid ligands in the study and treatment of mood disorders. *Pharmacol Ther* 123, 334-343
84 Newton, S.S.*, et al.* (2002) Inhibition of cAMP response element-binding protein or dynorphin in the nucleus accumbens produces an antidepressant-like effect. *J Neurosci* 22, 10883-10890
85 Bertrand, E.*, et al.* (1997) Social interaction increases the extracellular levels of [Met]enkephalin in the nucleus accumbens of control but not of chronic mild stressed rats. *Neuroscience* 80, 17-20
86 Cordonnier, L.*, et al.* (2005) Facilitation of enkephalins-induced delta-opioid behavioral responses by chronic amisulpride treatment. *Neuroscience* 135, 1-10
87 Nestler, E.J. (2005) Is there a common molecular pathway for addiction? *Nat Neurosci* 8, 1445-1449
88 Hipolito, L.*, et al.* (2008) Shell/core differences in mu- and delta-opioid receptor modulation of dopamine efflux in nucleus accumbens. *Neuropharmacology* 55, 183-189
89 Devoize, J.L.*, et al.* (1984) Influence of naloxone on antidepressant drug effects in the forced swimming test in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 84, 71-75
90 Tao, R. and Auerbach, S.B. (1995) Involvement of the dorsal raphe but not median raphe nucleus in morphine-induced increases in serotonin release in the rat forebrain. *Neuroscience* 68, 553-561
91 Fadda, P.*, et al.* (2005) Dopamine and serotonin release in dorsal striatum and nucleus accumbens is differentially modulated by morphine in DBA/2J and C57BL/6J mice. *Synapse* 56, 29-38
92 Tao, R. and Auerbach, S.B. (2002) GABAergic and glutamatergic afferents in the dorsal raphe nucleus mediate morphine-induced increases in serotonin efflux in the rat central nervous system. *J Pharmacol Exp Ther* 303, 704-710
93 Tao, R.*, et al.* (1998) Alteration in regulation of serotonin release in rat dorsal raphe nucleus after prolonged exposure to morphine. *J Pharmacol Exp Ther* 286, 481-488
94 Jolas, T.*, et al.* (2000) Chronic morphine increases GABA tone on serotonergic neurons of the dorsal raphe nucleus: association with an up-regulation of the cyclic AMP pathway. *Neuroscience* 95, 433-443
95 Anraku, T.*, et al.* (2001) Withdrawal from chronic morphine administration causes prolonged enhancement of immobility in rat forced swimming test. *Psychopharmacology (Berl)* 157, 217-220

96 Molina, V.A.*, et al.* (1994) Chronic variable stress or chronic morphine facilitates immobility in a forced swim test: reversal by naloxone. *Psychopharmacology (Berl)* 114, 433-440
97 Grasing, K. and Ghosh, S. (1998) Selegiline prevents long-term changes in dopamine efflux and stress immobility during the second and third weeks of abstinence following opiate withdrawal. *Neuropharmacology* 37, 1007-1017
98 Hodgson, S.R.*, et al.* (2009) Different affective response to opioid withdrawal in adolescent and adult mice. *Life Sci* 84, 52-60
99 Goeldner, C.*, et al.* (2011) Impaired emotional-like behavior and serotonergic function during protracted abstinence from chronic morphine. *Biol Psychiatry* 69, 236-244
100 Lutz, P.E.*, et al.* (2011) Sequential and opposing alterations of 5-HT(1A) receptor function during withdrawal from chronic morphine. *Eur Neuropsychopharmacol* 21, 835-840
101 Bambico, F.R.*, et al.* (2009) Decline in serotonergic firing activity and desensitization of 5-HT1A autoreceptors after chronic unpredictable stress. *Eur Neuropsychopharmacol* 19, 215-228
102 Lanfumey, L.*, et al.* (1999) 5-HT1A autoreceptor desensitization by chronic ultramild stress in mice. *Neuroreport* 10, 3369-3374
103 Zhao, Z.Q.*, et al.* (2007) Central serotonergic neurons are differentially required for opioid analgesia but not for morphine tolerance or morphine reward. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 14519-14524
104 Tao, R. and Auerbach, S.B. (2002) Opioid receptor subtypes differentially modulate serotonin efflux in the rat central nervous system. *J Pharmacol Exp Ther* 303, 549-556
105 Land, B.B.*, et al.* (2009) Activation of the kappa opioid receptor in the dorsal raphe nucleus mediates the aversive effects of stress and reinstates drug seeking. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 19168-19173
106 Rossetti, Z.L.*, et al.* (1993) Extraneuronal noradrenaline in the prefrontal cortex of morphine-dependent rats: tolerance and withdrawal mechanisms. *Brain Res* 609, 316-320
107 Delfs, J.M.*, et al.* (2000) Noradrenaline in the ventral forebrain is critical for opiate withdrawal-induced aversion. *Nature* 403, 430-434
108 Harris, G.C. and Aston-Jones, G. (2007) Activation in extended amygdala corresponds to altered hedonic processing during protracted morphine withdrawal. *Behav Brain Res* 176, 251-258
109 Tassin, J.P. (2008) Uncoupling between noradrenergic and serotonergic neurons as a molecular basis of stable changes in behavior induced by repeated drugs of abuse. *Biochem Pharmacol* 75, 85-97
110 McKittrick, C.R.*, et al.* (2000) Chronic social stress reduces dendritic arbors in CA3 of hippocampus and decreases binding to serotonin transporter sites. *Synapse* 36, 85-94
111 Bessa, J.M.*, et al.* (2009) The mood-improving actions of antidepressants do not depend on neurogenesis but are associated with neuronal remodeling. *Mol Psychiatry* 14, 764-773, 739
112 Snyder, J.S.*, et al.* (2011) Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. *Nature*
113 Hanson, N.D.*, et al.* (2011) Depression, antidepressants, and neurogenesis: a critical reappraisal. *Neuropsychopharmacology* 36, 2589-2602

114 Robinson, T.E.*, et al.* (2002) Widespread but regionally specific effects of experimenter- versus self-administered morphine on dendritic spines in the nucleus accumbens, hippocampus, and neocortex of adult rats. *Synapse* 46, 271-279

115 Eisch, A.J.*, et al.* (2000) Opiates inhibit neurogenesis in the adult rat hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 7579-7584

116 Eisch, A.J. and Harburg, G.C. (2006) Opiates, psychostimulants, and adult hippocampal neurogenesis: Insights for addiction and stem cell biology. *Hippocampus* 16, 271-286

117 Cominski, T.P.*, et al.* (2012) Loss of the mu opioid receptor on different genetic backgrounds leads to increased bromodeoxyuridine labeling in the dentate gyrus only after repeated injection. *Neuroscience* 206, 49-59

118 Harburg, G.C.*, et al.* (2007) Knockout of the mu opioid receptor enhances the survival of adult-generated hippocampal granule cell neurons. *Neuroscience* 144, 77-87

119 Li, Y.*, et al.* (2008) TrkB regulates hippocampal neurogenesis and governs sensitivity to antidepressive treatment. *Neuron* 59, 399-412

120 Ji, Y.*, et al.* (2005) Cyclic AMP controls BDNF-induced TrkB phosphorylation and dendritic spine formation in mature hippocampal neurons. *Nat Neurosci* 8, 164-172

121 Monteggia, L.M.*, et al.* (2007) Brain-derived neurotrophic factor conditional knockouts show gender differences in depression-related behaviors. *Biol Psychiatry* 61, 187-197

122 Torregrossa, M.M.*, et al.* (2004) The delta-opioid receptor agonist (+)BW373U86 regulates BDNF mRNA expression in rats. *Neuropsychopharmacology* 29, 649-659

123 Zhang, H.*, et al.* (2006) Endogenous opioids upregulate brain-derived neurotrophic factor mRNA through delta- and micro-opioid receptors independent of antidepressant-like effects. *Eur J Neurosci* 23, 984-994

124 Song, P. and Zhao, Z.Q. (2001) The involvement of glial cells in the development of morphine tolerance. *Neurosci Res* 39, 281-286

125 Persson, A.I.*, et al.* (2003) Mu- and delta-opioid receptor antagonists decrease proliferation and increase neurogenesis in cultures of rat adult hippocampal progenitors. *Eur J Neurosci* 17, 1159-1172

126 Dranovsky, A.*, et al.* (2011) Experience dictates stem cell fate in the adult hippocampus. *Neuron* 70, 908-923

127 Ansorge, M.S.*, et al.* (2007) Neurodevelopmental origins of depressive disorders. *Curr Opin Pharmacol* 7, 8-17

128 Bale, T.L.*, et al.* (2010) Early life programming and neurodevelopmental disorders. *Biol Psychiatry* 68, 314-319

129 Traudt, C.M.*, et al.* (2012) Postnatal morphine administration alters hippocampal development in rats. *J Neurosci Res* 90, 307-314

130 Klausz, B.*, et al.* (2011) Changes in adaptability following perinatal morphine exposure in juvenile and adult rats. *Eur J Pharmacol* 654, 166-172

131 de Cubas, M.M. and Field, T. (1993) Children of methadone-dependent women: developmental outcomes. *Am J Orthopsychiatry* 63, 266-276

132 Ornoy, A.*, et al.* (1996) The developmental outcome of children born to heroin-dependent mothers, raised at home or adopted. *Child Abuse Negl* 20, 385-396

133 Meyer-Lindenberg, A. and Tost, H. (2012) Neural mechanisms of social risk for psychiatric disorders. *Nat Neurosci*

134 Stein, D.J.*, et al.* (2007) Opioids: from physical pain to the pain of social isolation. *CNS Spectr* 12, 669-670, 672-664

135 Eisenberger, N.I. (2012) The pain of social disconnection: examining the shared neural underpinnings of physical and social pain. *Nat Rev Neurosci*

136 Panksepp, J. (2003) Neuroscience. Feeling the pain of social loss. *Science* 302, 237-239

137 Kennedy, B.C.*, et al.* (2012) Social influences on morphine-conditioned place preference in adolescent BALB/cJ and C57BL/6J mice. *Psychopharmacology (Berl)* 219, 923-932

138 Komatsu, H.*, et al.* (2011) Decreased response to social defeat stress in mu-opioid-receptor knockout mice. *Pharmacol Biochem Behav* 99, 676-682

139 Mague, S.D. and Blendy, J.A. (2010) OPRM1 SNP (A118G): involvement in disease development, treatment response, and animal models. *Drug Alcohol Depend* 108, 172-182

140 Troisi, A.*, et al.* (2011) Social hedonic capacity is associated with the A118G polymorphism of the mu-opioid receptor gene (OPRM1) in adult healthy volunteers and psychiatric patients. *Soc Neurosci* 6, 88-97

141 Way, B.M.*, et al.* (2009) Variation in the mu-opioid receptor gene (OPRM1) is associated with dispositional and neural sensitivity to social rejection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 15079-15084

142 Resendez, S.L.*, et al.* (2012) kappa-Opioid Receptors within the Nucleus Accumbens Shell Mediate Pair Bond Maintenance. *J Neurosci* 32, 6771-6784

143 Niesink, R.J.*, et al.* (1999) Social behavior of juvenile rats after in utero exposure to morphine: dose-time-effect relationship. *Neuropharmacology* 38, 1207-1223

144 Hol, T.*, et al.* (1996) Prenatal exposure to morphine affects juvenile play behavior and adult social behavior in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 55, 615-618

145 Moles, A.*, et al.* (2004) Deficit in attachment behavior in mice lacking the mu-opioid receptor gene. *Science* 304, 1983-1986

146 Barr, C.S.*, et al.* (2008) Variation at the mu-opioid receptor gene (OPRM1) influences attachment behavior in infant primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 5277-5281

147 Copeland, W.E.*, et al.* (2011) Child mu-opioid receptor gene variant influences parent-child relations. *Neuropsychopharmacology* 36, 1165-1170

148 Liu, D.*, et al.* (1997) Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science* 277, 1659-1662

149 Kalinichev, M.*, et al.* (2001) Early neonatal experience of Long-Evans rats results in long-lasting changes in morphine tolerance and dependence. *Psychopharmacology (Berl)* 157, 305-312

150 Kalinichev, M.*, et al.* (2001) Repeated neonatal maternal separation alters morphine-induced antinociception in male rats. *Brain Res Bull* 54, 649-654

151 Weaver, S.A.*, et al.* (2007) Maternal separation leads to persistent reductions in pain sensitivity in female rats. *J Pain* 8, 962-969

152 Ladd, G.W. (1999) Peer relationships and social competence during early and middle childhood. *Annu Rev Psychol* 50, 333-359
153 Trezza, V.*, et al.* (2010) The pleasures of play: pharmacological insights into social reward mechanisms. *Trends Pharmacol Sci* 31, 463-469
154 Panksepp, J.B. and Lahvis, G.P. (2007) Social reward among juvenile mice. *Genes Brain Behav* 6, 661-671
155 Trezza, V.*, et al.* (2009) Conditioned place preference induced by social play behavior: parametrics, extinction, reinstatement and disruption by methylphenidate. *Eur Neuropsychopharmacol* 19, 659-669
156 Depue, R.A. and Morrone-Strupinsky, J.V. (2005) A neurobehavioral model of affiliative bonding: implications for conceptualizing a human trait of affiliation. *Behav Brain Sci* 28, 313-350; discussion 350-395
157 Van den Berg, C.L.*, et al.* (1999) Morphine treatment during juvenile isolation increases social activity and opioid peptides release in the adult rat. *Brain Res* 830, 16-23
158 Vanderschuren, L.J.*, et al.* (1995) Mu- and kappa-opioid receptor-mediated opioid effects on social play in juvenile rats. *Eur J Pharmacol* 276, 257-266
159 Spinka, M.*, et al.* (2001) Mammalian play: training for the unexpected. *Q Rev Biol* 76, 141-168
160 Kessler, R.C. (2004) The epidemiology of dual diagnosis. *Biol Psychiatry* 56, 730-737
161 Paterson, N.E. and Markou, A. (2007) Animal models and treatments for addiction and depression co-morbidity. *Neurotox Res* 11, 1-32
162 Escriba, P.V.*, et al.* (2004) Increased mRNA expression of alpha2A-adrenoceptors, serotonin receptors and mu-opioid receptors in the brains of suicide victims. *Neuropsychopharmacology* 29, 1512-1521
163 Gabilondo, A.M.*, et al.* (1995) Increased density of mu-opioid receptors in the postmortem brain of suicide victims. *Brain Res* 682, 245-250
164 Gross-Isseroff, R.*, et al.* (1990) Regionally selective increases in mu opioid receptor density in the brains of suicide victims. *Brain Res* 530, 312-316
165 Zubieta, J.K.*, et al.* (2003) Regulation of human affective responses by anterior cingulate and limbic mu-opioid neurotransmission. *Arch Gen Psychiatry* 60, 1145-1153
166 Kennedy, S.E.*, et al.* (2006) Dysregulation of endogenous opioid emotion regulation circuitry in major depression in women. *Arch Gen Psychiatry* 63, 1199-1208
167 Fredriksson, R.*, et al.* (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 63, 1256-1272
168 Manglik, A.*, et al.* (2012) Crystal structure of the micro-opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature*
169 Granier, S.*, et al.* (2012) Structure of the delta-opioid receptor bound to naltrindole. *Nature* 485, 400-404
170 Wu, H.*, et al.* (2012) Structure of the human kappa-opioid receptor in complex with JDTic. *Nature*
171 Buchen, L. (2012) Opioid receptors revealed. *Nature* 483, 383
172 Rozenfeld, R.*, et al.* (Humana 2011) in *The Opiate Receptors*. Vol. 23 (ed. Pasternak, G. W.) Ch. 15 407–437

173 He, L.*, et al.* (2002) Regulation of opioid receptor trafficking and morphine tolerance by receptor oligomerization. *Cell* 108, 271-282

174 Jordan, B.A. and Devi, L.A. (1999) G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature* 399, 697-700

175 Shukla, A.K.*, et al.* (2011) Emerging paradigms of beta-arrestin-dependent seven transmembrane receptor signaling. *Trends Biochem Sci* 36, 457-469

176 Kieffer, B.L. and Evans, C.J. (2009) Opioid receptors: from binding sites to visible molecules in vivo. *Neuropharmacology* 56 Suppl 1, 205-212

177 Reiter, E.*, et al.* (2012) Molecular mechanism of beta-arrestin-biased agonism at seven-transmembrane receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 52, 179-197

178 Kenakin, T. (2011) Functional selectivity and biased receptor signaling. *J Pharmacol Exp Ther* 336, 296-302

179 Galandrin, S.*, et al.* (2007) The evasive nature of drug efficacy: implications for drug discovery. *Trends Pharmacol Sci* 28, 423-430

180 Bosier, B. and Hermans, E. (2007) Versatility of GPCR recognition by drugs: from biological implications to therapeutic relevance. *Trends Pharmacol Sci* 28, 438-446

181 Keith, D.E.*, et al.* (1996) Morphine activates opioid receptors without causing their rapid internalization. *J Biol Chem* 271, 19021-19024

182 Berger, A.C. and Whistler, J.L. (2011) Morphine-induced mu opioid receptor trafficking enhances reward yet prevents compulsive drug use. *EMBO Mol Med* 3, 385-397

183 Groer, C.E.*, et al.* (2011) Agonist-directed interactions with specific beta-arrestins determine mu-opioid receptor trafficking, ubiquitination, and dephosphorylation. *J Biol Chem* 286, 31731-31741

184 Kim, J.A.*, et al.* (2008) Morphine-induced receptor endocytosis in a novel knockin mouse reduces tolerance and dependence. *Curr Biol* 18, 129-135

185 Bruchas, M.R. and Chavkin, C. (2010) Kinase cascades and ligand-directed signaling at the kappa opioid receptor. *Psychopharmacology (Berl)* 210, 137-147

186 Pradhan, A.A.*, et al.* (In press) Ligand-Directed Signaling Within the Opioid Receptor Family. *Br J Pharmacol*

187 Katz, R.J.*, et al.* (1981) Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression. *Neurosci Biobehav Rev* 5, 247-251

188 Siegfried, B.*, et al.* (1984) Defeat, learned submissiveness, and analgesia in mice: effect of genotype. *Behav Neural Biol* 42, 91-97

189 Berton, O.*, et al.* (2006) Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science* 311, 864-868

190 Kameyama, T. and Nagasaka, M. (1982) Effects of apomorphine and diazepam on a quickly learned conditioned suppression in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 17, 59-63

191 Tzschentke, T.M. (2007) Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addict Biol* 12, 227-462

192 Porsolt, R.D.*, et al.* (1977) Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266, 730-732

193 Seligman, M.E. and Beagley, G. (1975) Learned helplessness in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 88, 534-541

194 Hofer, M.A. (1970) Physiological responses of infant rats to separation from their mothers. *Science* 168, 871-873

195 File, S.E. and Hyde, J.R. (1978) Can social interaction be used to measure anxiety? *Br J Pharmacol* 62, 19-24

196 Willner, P.*, et al.* (1987) Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology (Berl)* 93, 358-364

197 Steru, L.*, et al.* (1985) The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 85, 367-370

198 Sery, O.*, et al.* (2010) A118G polymorphism of OPRM1 gene is associated with schizophrenia. *J Mol Neurosci* 41, 219-222

199 Prossin, A.R.*, et al.* (2010) Dysregulation of regional endogenous opioid function in borderline personality disorder. *Am J Psychiatry* 167, 925-933

200 Kato, T.*, et al.* (2007) Animal models of bipolar disorder. *Neurosci Biobehav Rev* 31, 832-842

201 Olmstead, M.C.*, et al.* (2009) Mu and delta opioid receptors oppositely regulate motor impulsivity in the signaled nose poke task. *PLoS One* 4, e4410

202 Chevallier, C.*, et al.* (2012) The social motivation theory of autism. *Trends Cogn Sci*

203 Shippenberg, T.S.*, et al.* (2008) Targeting endogenous mu- and delta-opioid receptor systems for the treatment of drug addiction. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 7, 442-453

204 Tejeda, H.A.*, et al.* (2012) The dynorphin/kappa-opioid receptor system and its role in psychiatric disorders. *Cell Mol Life Sci* 69, 857-896

205 Slowe, S.J.*, et al.* (1999) Quantitative autoradiography of mu-,delta- and kappa1 opioid receptors in kappa-opioid receptor knockout mice. *Brain Res* 818, 335-345

206 Goody, R.J.*, et al.* (2002) Quantitative autoradiographic mapping of opioid receptors in the brain of delta-opioid receptor gene knockout mice. *Brain Res* 945, 9-19

207 Kitchen, I.*, et al.* (1997) Quantitative autoradiographic mapping of mu-, delta- and kappa-opioid receptors in knockout mice lacking the mu-opioid receptor gene. *Brain Res* 778, 73-88

Figure 1. Opioid receptor knockout mice phenotypes in models of addiction and mood disorders. Behavioral modifications in mutant mice are summarized for each receptor knockout mouse line. Important conclusions from these data are the following: mu receptors are key mediators of both natural and artificial rewards, and may show pro-depressant activity although this is not supported by the pharmacology. Kappa receptors mediate dysphoria particularly under stressful conditions where the dynorphin/kappa receptor tone is higher. Delta receptors decrease levels of anxiety and reduce depressive-like behaviors, while their role in reward remains debated. Exhaustive reviews are available on the role of mu receptors in reward processes [1], the emerging roles of delta receptors in brain disorders [37], the potential of mu and delta receptors as targets to treat addiction [203], and the role of kappa receptors in stress-induced and pro-addictive behaviors [46] or more general psychiatric disorders [204].

CPP, conditioned place preference; CPA conditioned place aversion, see Glossary.

Figure 2. Opioid and monoaminergic systems. Schematic representation of brain monoaminergic pathways. Opioid receptors are broadly expressed throughout these circuits where they modulate monoaminergic neurons. **(A)** Mu and delta receptors disinhibit, while kappa receptors inhibit, serotonergic (5-HT) and dopaminergic (DA) neurons. Noradrenergic neurons are directly inhibited by mu receptors. **(B)** Schematic representation of main monoaminergic nuclei and projections forming neural circuitry of reward processing and emotional responses, as discussed in the present review. Dysfunction in the mesolimbic DA circuit [81] is mostly associated with anhedonia and reduced motivation at the level of ventral tegmental area (VTA) and nucleus accumbens (NAc). 5-HT and NA neurons originating from the dorsal raphe nucleus (DRN) and the locus coeruleus (LC) respectively, project widely throughout the brain with a main implication of hippocampal (Hipp), prefrontal cortex (FCx), nucleus accumbens (NAc) and bed nucleus of the stria terminalis (BNST) projection areas involved in mood disorders, and amygdala is a main brain site for emotional dysfunctions [79]. **(C)** Opioid receptors are expressed throughout neural circuits of mood **(D)** and absolute expression levels of mu, delta and kappa receptors across relevant brain structures are shown. Opioid receptors show highly distinct distribution patterns, both anatomically and in terms of expression levels (from [205-207]).

Table1. Antidepressant-like effects of mu and delta agonists, and kappa antagonists, in rodent models of depression (see Glossary for a definition of each test). Top of the table shows general opioid effects, where mu, delta or kappa specificity was not addressed. BUBU=Tyr-D.Ser-O-tert-butyl.-Gly-Phe-Leu-ThrO-Tet-butyl-OH. BW363U86 = (+)-4-[(R)-[(2S,5R)-2,5-dimethyl-4-(2-propenyl)-1-piperazinyl]-(3-hydroxyphenyl)methyl]-N,N-diethylbenzamide dihydrochloride. DPDPE=Tyr-D-Pen-Gly-Phe-D-Pen. Deltorphin II=Tyr-D-Ala-Phe-Glu-Val-Val-Gly-NH2. JDTic=(3R)-7-hydroxy-N-[(1S)-1-[[(3R,4R)-4-(3-hydroxyphenyl)-3,4-dimethyl-1-piperidinyl]-methyl]-2-methylpropyl]-1,2,3,4-tetrahydro-3isoquinolinec arboxamide. JOM-13 (a systemically active derivative of DPDPE)=Tyr-c[D-Cys-Phe-DDPen]OH. NIH-11082=(−)-(1R,5R,9R)-5,9-dimethyl-2′-hydroxy-2-(6-hydroxyhexyl)-6,7-benzomorphan hydrochloride. Nor-BNI=nor-binaltorphimine. RB38A=(R,S)HONH-CO-CH2-CH-(CH2CH6H5)-CONH-CH(CH2-C6H5)-COOH. RB38B=(S,S)HONH-CO-CH2-CH-(CH2C6H5)-CONH-CH-(CH2C6H5)-COOH. RB101=H3N-

CH(CH2-CH2-SCH3)-CH2-S-S-CH2-CH(CH2)-CONH-CH(CH2)-COOCH2. SNC-80=([()-4-[(*R)--[(2S,5R)*-2,5-dimethyl-4-(2-propenyl)-1-piperazinyl]-(3-methoxyphenyl)-methyl]-*N,N-diethylbenzamide.* U-69593=[5alpha,7alpha,8beta]-N-methyl-N-[7-[1-pyrrolidinyl]-1-oxaspiro[4.5]dec8-y l]-benzenacetamide. UFP-512=H-Dmt-Tic-NH-CH(CH2-COOH)-Bid.

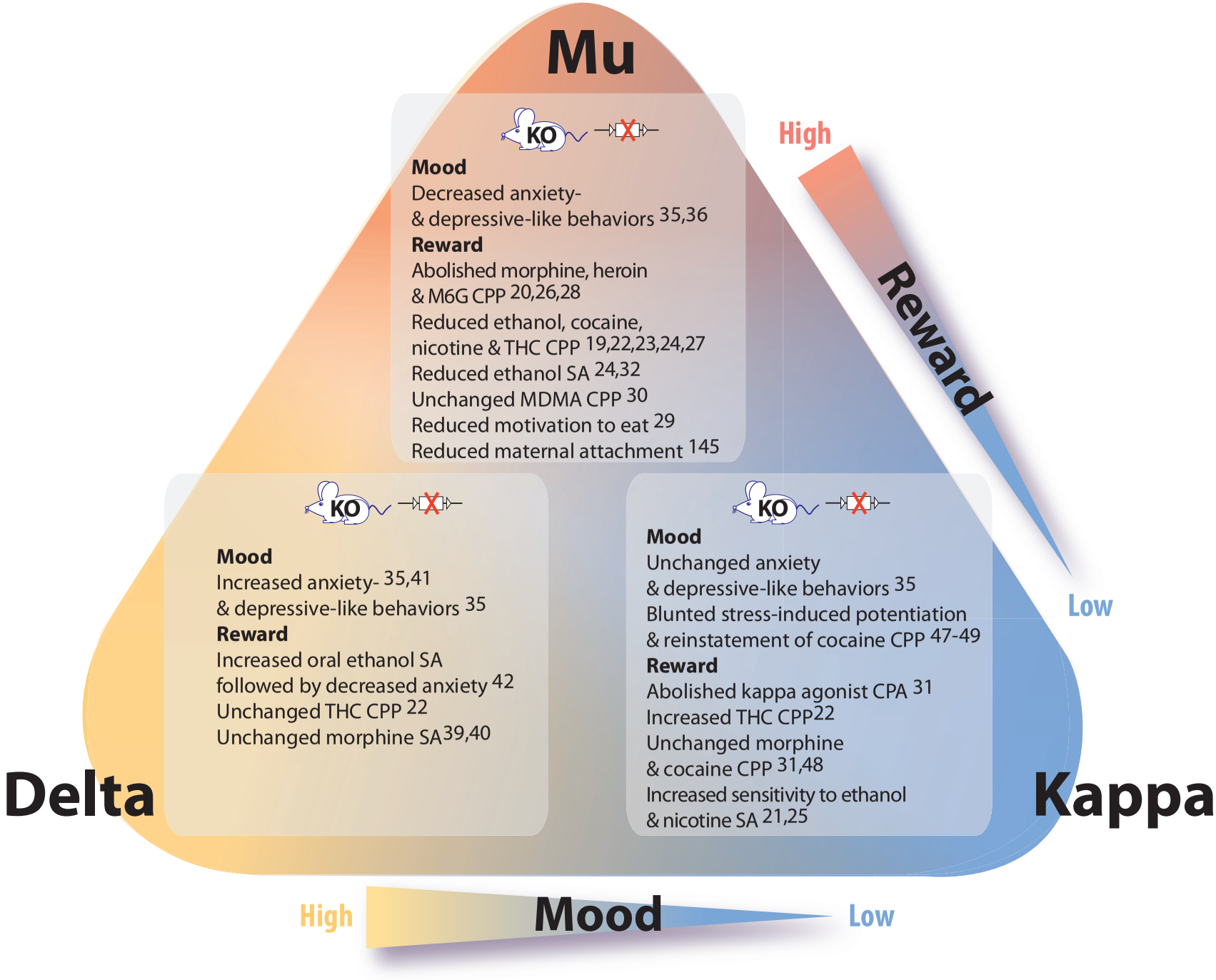


Fig1. Lutz & Kieffer

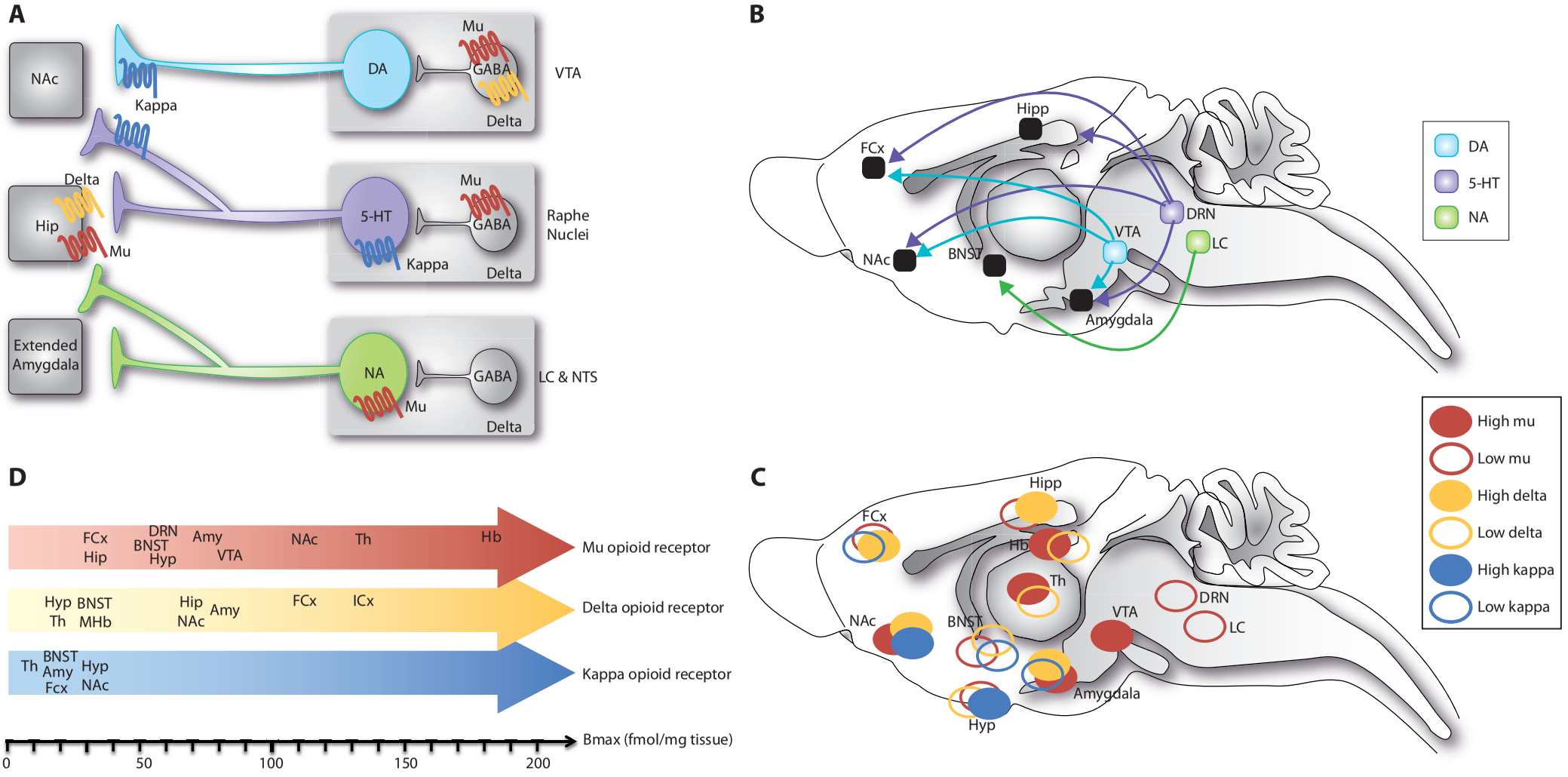


Fig2. Lutz & Kieffer

Target	Compound	Activity	Species	Behavior	Effect	Ref
opioid receptors	enkephalins & endorphins	endogenous agonists	rat	forced swim	antidepressant	51
opioid receptors	RB38A & RB38B	enkephalinase inhibitors	rat	learned helplessness	antidepressant	52
opioid receptors	naloxone	general antagonist	rat	learned helplessness	depressant	53
delta	BUBU	agonist	rat	learned helplessness	antidepressant	54
delta	RB 101	enkephalinase inhibitor	rat	learned helplessness	antidepressant	
delta	RB 101	enkephalinase inhibitor	rat	forced swim	antidepressant	68
delta	Opiorphin	endogenous enkephalinase inhibitor	rat	forced swim	antidepressant	63
delta	SNC-80, BW363U86	agonists	rat	forced swim	antidepressant	61
delta	SNC-80, BW363U86	agonists	rat	forced swim	antidepressant	62
delta	SNC-80	agonist	rat	forced swim	antidepressant	67
delta	SNC-80, SNC-86, SNC-162	agonists	rat	forced swim	antidepressant	64
delta	SNC-80 (acute)	agonist	rat	forced swim	antidepressant	66
delta	SNC-80 (acute & chronic)	agonist	rat	forced swim	antidepressant	65
delta	DPDPE, deltorphin II, JOM-13, H-Dmt-Tic-NH-CH2-Bid	agonists	rat	forced swim	antidepressant	70
delta	SNC-80 (chronic)	agonist	rat	olfactory bulbectomy	antidepressant	69
delta	UFP-512	agonist	rat & mouse	forced swim	antidepressant	59
delta	RB101	enkephalinase inhibitor	mouse	forced swim, conditioned suppression of motility	antidepressant	55
delta	RB101	enkephalinase inhibitor	mouse	forced swim	antidepressant	58
delta	opiorphin	endogenous enkephalinase inhibitor	mouse	forced swim	antidepressant	60
delta	SNC-80	agonist	mouse	forced swim	antidepressant	56
delta	KNT-127	agonist	mouse	forced swim	antidepressant	57
delta	NIH-11082	agonist	mouse	tail suspension	antidepressant	71
mu	morphine	agonist	rat	learned helplessness	antidepressant	53
mu	morphine	agonist	rat	learned helplessness	antidepressant	72
mu	levorphanol, methadone , tramadol	agonists	rat	learned helplessness	antidepressant	73
mu	opiorphin	endogenous enkephalinase inhibitor	mouse	forced swim	antidepressant	60
mu	codeine, tramadol	agonists	mouse	tail suspension	antidepressant	75
mu	morphine, codeine, levorphanol, methadone , tramadol	agonists	mouse	tail suspension	antidepressant	74
kappa	nor-BNI	antagonist	rat	learned helplessness	antidepressant	77
kappa	U-69593	agonist	rat	forced swim	depressant	76
kappa	nor-BNI	antagonist	rat	forced swim	antidepressant	
kappa	nor-BNI, JDTic	antagonist	rat	forced swim	antidepressant	78

Table1. Lutz & Kieffer

RESULTATS EXPERIMENTAUX

CHAPITRE V. MODELISATION DE L'ABSTINENCE A LA MORPHINE CHEZ LA SOURIS

Ce travail expérimental s'inscrit dans une démarche de modélisation chez la souris de la comorbidité que nous avons abondamment décrite. Nous faisons le choix d'explorer l'hypothèse d'une relation causale entre les 2 pathologies, selon laquelle l'établissement de la dépendance aux opiacés pourrait induire ultérieurement un dysfonctionnement émotionnel. Nous avons postulé que suite à l'établissement de la dépendance physique à la morphine et au-delà des signes physiques du sevrage, des troubles des fonctions émotionnelles pourraient se développer chez la souris. Nous avons établi dans notre laboratoire un modèle murin de l'abstinence à la morphine, un opiacé de référence. Des souris adultes reçoivent pendant 6 jours des injections de doses croissantes de morphine, suivies d'une période de sevrage prolongée, c'est-à-dire d'abstinence. Les souris abstinentes développent progressivement des déficits comportementaux apparentés à la dépression, correspondant après 4 semaines à un retrait social et à l'augmentation d'un comportement de désespoir. Surtout, ces déficits peuvent être prévenus par un traitement chronique par la fluoxétine (FLX), un antidépresseur agissant sur le système sérotoninergique (**Article 2**). Ce résultat confère une validité prédictive à notre modèle.

Les neurones sérotoninergiques se concentrent principalement dans le DRN et envoient des projections axonales dans tout le cerveau. Dans notre modèle d'abstinence, nous avons montré que le traitement morphinique chronique perturbe profondément l'activité des neurones sérotoninergiques, induisant des adaptations fonctionnelles successives du 5-HT_{1A}R, qui joue un rôle central dans la régulation de leur activité (**Article 3**). De plus, le traitement morphinique induit une activation forte de ces neurones, se traduisant par une augmentation du turnover de la sérotonine dans plusieurs régions du cerveau antérieur. Cette adaptation biochimique reste détectable uniquement dans le DRN après 4 semaines d'abstinence (**Article 2**), ce qui suggère un rôle déterminant pour cette structure au cours de l'abstinence.

Ainsi, nos résultats indiquent qu'il est possible de modéliser la comorbidité entre dépendance aux opiacés et dépression chez la souris et de mesurer l'apparition de troubles de type dépressifs suite à un traitement morphinique chronique.

L'adolescence constitue chez l'homme une période de plasticité et de maturation émotionnelle cruciale, qui conditionne le risque psychopathologique tout au long de la vie. Notamment, une dépendance à une substance psychoactive au cours de l'adolescence induit un risque dépressif majoré à l'âge adulte. Nous avons utilisé notre modèle d'abstinence pour étudier cette comorbidité particulière. Les souris ont reçu le même traitement morphinique que précédemment, mais au cours d'une période correspondant selon la littérature à un équivalent d'adolescence (jours 30 à 35 de vie post-natale). Après 4 semaines d'abstinence, le comportement des souris devenues adultes a été

étudié. En outre, afin d'étudier l'impact des facteurs génétiques dans notre modèle, nous avons comparé différentes souches de souris consanguines : C57BL/6J (même souche que dans notre étude précédente chez l'adulte), C57BL/6N et Balb/cJ. Nous avons retrouvé chez les animaux devenus adultes une augmentation des comportements apparentés à la dépression, et de façon plus surprenante, une augmentation des comportements sociaux. Ces résultats sont rassemblés dans un manuscrit soumis (**Article 4**).

ARTICLE 2

Impaired emotional-like behavior and serotonergic function during protracted abstinence from chronic morphine.

Goeldner C, Lutz PE, Darcq E, Halter T, Clesse D, Ouaggazal AM, Kieffer BL.
Biological Psychiatry (2011) 69(3):236-44.

Impaired Emotional-Like Behavior and Serotonergic Function During Protracted Abstinence from Chronic Morphine

Celia Goeldner, Pierre-Eric Lutz, Emmanuel Darcq, Thomas Halter, Daniel Clesse, Abdel-Mouttalib Ouagazzal, and Brigitte L. Kieffer

Background: Opiate abuse is a chronic relapsing disorder, and maintaining prolonged abstinence remains a major challenge. Protracted abstinence is characterized by lowered mood, and clinical studies show elevated comorbidity between addiction and depressive disorders. At present, their relationship remains unclear and has been little studied in animal models. Here we investigated emotional alterations during protracted abstinence, in mice with a history of chronic morphine exposure.

Methods: C57BL6J mice were exposed to a chronic intermittent escalating morphine regimen (20–100 mg/kg). Physical dependence (naloxone-precipitated withdrawal), despair-related behaviors (tail suspension test), and social behaviors were examined after 1 or 4 weeks of abstinence. Stress hormones and forebrain bioamine levels were analyzed at the end of morphine regimen and after 4 weeks of abstinence. Finally, we examined the effects of chronic fluoxetine during abstinence on morphine-induced behavioral deficits.

Results: Acute naloxone-induced withdrawal was clearly measurable after 1 week, and became undetectable after 4 weeks. In contrast, social and despair-related behaviors were unchanged after 1 week, but low sociability and despair-like behavior became significant after 4 weeks. Chronic morphine regimen increased both corticosterone levels and forebrain serotonin turnover, but only serotonergic activity in the dorsal raphe remained impaired after 4 weeks. Remarkably, chronic fluoxetine prevented depressive-like behavioral deficits in 4-week abstinent mice.

Conclusions: During protracted abstinence, the immediate consequences of morphine exposure attenuate, whereas fluoxetine-sensitive emotional alterations strengthen with time. Our study establishes a direct link between morphine abstinence and depressive-like symptoms and strongly suggests that serotonin dysfunction represents a main mechanism contributing to mood disorders in opiate abstinence.

Key Words: Depression, dorsal raphe, fluoxetine, incubation, opiates, serotonin

Addiction is a chronic relapsing disorder (1-4). A major issue in recovering from addiction is to maintain a drug-free or abstinent state. For drug abusers, permanently achieving this goal involves several steps. Acute withdrawal from chronic opiates is considered a detoxification period during which the drug is cleared from the body, which is completed within a few days. This process produces a well-characterized aversive emotional state and physical symptoms, which occur spontaneously but can also be precipitated by opiate receptor antagonists. Alleviation of this acute aversive episode via drug intake (i.e., negative reinforcement) has been implicated in the maintenance of an established addiction (5,6). Acute withdrawal does not solely account for the relapse process, however. Reinstatement of drug abuse often occurs after prolonged periods of abstinence, when withdrawal symptoms are no longer detectable. This particular condition, classically defined as protracted abstinence, is characterized by symptoms reminiscent of anxiety and depression, including restlessness, high emotionality, and lowered mood (7,8). Epidemiologic retrospective studies report a clear association between opiate addiction and major depressive disorders (9,10) that likely contribute to relapse.

Few animal studies have modeled the emotional consequences of protracted opiate abstinence following spontaneous withdrawal. In rodents, behavioral data indicate that motivation for natural reinforcers decreases (11-13), whereas conditioning for drug-associated compartments or cues strengthens with time, up to 4 to 5 weeks following drug discontinuation (14,15), and relapse-tendencies persist up to 1 year (16).

Other studies have also demonstrated increased vulnerability to stress in rats spontaneously withdrawn from morphine for 7 days, as measured by decreased social interaction after restraint stress (17) and after intracerebroventricular corticotropin-releasing-factor administration (18), or increased shock-probe-induced defensive burying after a 2-week abstinence period (19,20). In the forced swim test, rats showed increased depressive-like behavior after a short morphine withdrawal period (3 days) (21,22), and one study only reported detectable depressive-like behavior following prolonged morphine abstinence (2 and 3 weeks) (23).

Potential mechanisms underlying the negative emotional aspects of opiate dependence and acute withdrawal involve stress systems and aminergic neurotransmission (24-27). In rats and mice (28,29), acute systemic administration of morphine enhances serotonin concentration in the dorsal raphe nucleus (DR), where 5-hydroxytryptamine (5-HT) neurons originate, and in several forebrain regions. Although 5-HT is not mandatory for morphine reinforcement (30) or withdrawal (31), electrical stimulation of the DR reduces morphine self-administration and withdrawal symptoms (32). In addition, acute (33,34) or subchronic serotonin reuptake inhibitors administration reduces physical (35,36) and negative motivational withdrawal symptoms (37) following chronic morphine. Hence interactions exist among opioids, stress, and 5-HT system in

From the Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (CG, P-EL, ED, TH, A-MO, BLK), Centre National de la Recherche Scientifique/Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale/Université de Strasbourg, Illkirch, and Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives (DC), Centre National de la Recherche Scientifique, Strasbourg, France.

Address correspondence to Brigitte L. Kieffer, Ph.D., IGBMC, Department Neurobiology and Genetics Parc d'innovation 1 rue Laurent Fries BP 10142; 67404 Illkirch cedex France; E-mail: briki@igbmc.fr.

Received Mar 25, 2010; revised Aug 10, 2010; accepted Aug 13, 2010

0006-3223/$36.00
doi:10.1016/j.biopsych.2010.08.021

© 2011 Society of Biological Psychiatry

dependence and acute withdrawal processes. How these interactions evolve after protracted abstinence, and whether long-term neuroadaptations in those systems contribute to aberrant emotional-like behaviors associated to protracted abstinence, is unknown.

In this study, we used a classical mouse model of morphine dependence and examined long-term consequences of chronic exposure to the drug. We analyzed physical dependence to morphine, changes in social, anxiety, and despair-related behaviors, as well as circulating stress hormones and biogenic amines levels in limbic structures in the course of withdrawal and after a short (1 week) or prolonged period of abstinence (4 weeks). Our data show major modifications of emotional-like responses and serotonergic function in abstinent animals. Importantly, the development of behavioral alterations was prevented by fluoxetine treatment during the 4-week abstinence period, strongly supporting the notion that serotonergic mechanisms underlie the depressive-like features that characterize protracted abstinence from chronic morphine.

Methods and Materials

Animals

Eight-week-old male C57BL/6J mice (Charles Rivers Laboratories, St.-Germain-sur-l'Arbresle, France) were habituated to housing conditions 2 weeks before testing. Animals were housed four/cage and were maintained under standard laboratory conditions. All experimental procedures were performed according to standard ethical guidelines (European Community Guidelines on the Care and Use of Laboratory Animals 86/609/EEC).

Drugs

Morphine sulfate (Francopia, Gentilly, France) and naloxone hydrogen chloride (RBI, Natick, Massachusetts) were prepared in saline (.9% sodium chloride) and injected at a volume of 10 mL/kg. Fluoxetine hydrochloride (Sigma-Aldrich, Lyon, France) was supplemented in food pellets. See Supplemental Methods and Materials in Supplement 1.

General Procedure

Dependence. Twice daily escalating doses of morphine (20, 40, 60, 80, 100 mg/kg) or saline were administered intraperitoneally for 5 days, followed by a single 100 mg/kg injection on Day 6. To confirm the induction of physical dependence, withdrawal was precipitated with naloxone (1 mg/kg) administered subcutaneously 2 hours after the last morphine or saline injection (n = 4/group). Somatic withdrawal signs (jumps, paw tremors, wet-dog shakes, sniffings) were scored for 25 min (38,39).

Development of Abstinence. Mice were maintained drug-free after chronic treatment, and experienced spontaneous withdrawal in their home cages. 1 or 4 weeks following the last injection, emotional-like and social behaviors of abstinent mice (1 week, n = 8; 4 weeks, n = 8) and saline controls (1 week, n = 8; 4 weeks, n = 8) were evaluated. To monitor physical dependence throughout the abstinence period, withdrawal was precipitated in a separate cohort of animals 2 hours after a single morphine injection (50 mg/kg) in abstinent mice (40) (1 week, n = 5; 4 weeks, n = 5) or saline controls (1 week, n = 5; 4 weeks, n = 5). We used a subeffective dose of naloxone (41) so that mice previously exposed to saline showed few withdrawal signs.

Sensitivity to Fluoxetine. Two independent sets of experiments were conducted with n = 9 or 10 mice/group, and data were pooled (n = 19–20). Fluoxetine was administered 4 weeks per os (0 or 10 mg/kg/24 hours; see Supplemental Methods and Materials in Supplement 1). Behavioral analysis was performed drug free. The 10 mg/kg dose was based on pilot studies (see Supplemental Methods and Materials and Figure S1 in Supplement 1).

Behavioral Testing

Animals previously exposed to chronic morphine or saline (1 or 4 weeks after treatment) underwent open-field, social interaction, and tail suspension (TST) tests, in that order. The light–dark test was performed on a separate group of animals. See detailed procedures in Supplemental Methods and Materials in Supplement 1.

Biochemical Analysis

Experiments were performed following chronic morphine treatment (2 hours) or after 4 weeks of spontaneous withdrawal, on a separate cohort of animals, which did not undergo behavioral testing (n = 6/group). Adrenocorticotropic hormone and corticosterone plasma levels were measured using radioimmunoassays. Bioamine levels and their metabolites were measured in prefrontal cortex (PFC), hippocampus (HIPP), central amygdala, and DR using high-performance liquid chromatography performed on microdissected brain samples (see Supplemental Methods and Materials in Supplement 1 for details). 5-HT turnover rate was determined as 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA)/5-HT. For both hormonal and neurochemical assessments one mouse was excluded from the study as it presented abnormal values in all parameters in both assays (n = 5–6/group).

Statistical Analysis

All data are expressed as mean ± SEM. Statistical analysis was performed using one- and two-way analysis of variance (ANOVA) with independent and repeated measures, or unpaired t tests in accordance with the experimental design. Between subjects two-way ANOVA was used to analyze the effect of morphine treatment and time in time-course experiments or morphine and fluoxetine treatments. In case of significant main effect or interactions following ANOVA, multiple group comparisons were performed using Fischer's post hoc analysis. Statistical significance was defined as $p < .05$.

Results

Chronic Morphine Treatment Induces Physical Dependence

The experimental timeline is shown in Figure 1A. A weight curve is shown for a group of 4-week abstinent mice (n = 14) that were used for behavior (n = 8) or neurochemical assessment (n = 6). Repeated ANOVA indicated that morphine treatment reduced body weight [$F(1,26) = 6.8$; $p < .01$] over time [interaction: $F(14,308) = 32.3$; $p < .0001$]. This decrease was significant as of the second day of injections (post hoc analysis, $p < .01$) and persisted for 2 days after the last morphine injection on Day 6 (post hoc analysis, $p < .0001$ from Days 3–8). After 1 and 4 weeks of abstinence, morphine-treated mice recovered body weight similar to saline-treated mice (post hoc analysis, $p > .05$ for both).

We verified that physical dependence had been established following chronic morphine exposure (n = 4/group) by measuring naloxone-precipitated withdrawal symptoms (Figure 1B). Two hours after the last morphine or saline injection on Day 6, a single naloxone dose was administered. Morphine-treated mice showed significantly more withdrawal signs in response to naloxone, including jumps, paw tremors, sniffings, and wet dog shakes (unpaired t test, $p < .01$ for all parameters).

Physical Dependence Decreases During Protracted Abstinence

We monitored the evolution of physical dependence during spontaneous withdrawal after drug cessation. Figure 1C shows

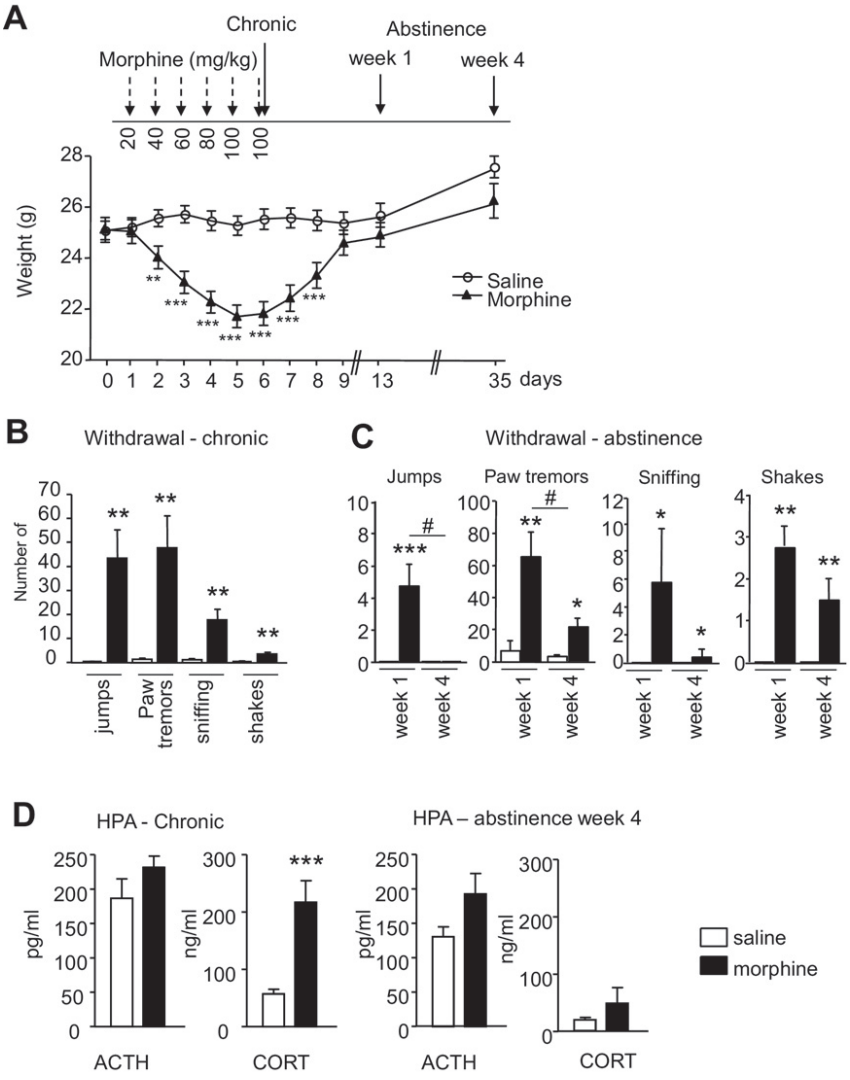


Figure 1. Physical dependence and hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis hyperactivity decline during protracted abstinence. **(A)** Timeline of the experiment. Dashed arrows indicate morphine doses injected twice daily. Black arrows indicate chronic, 1- and 4-week abstinence time points under study. Morphine treatment reduced body weight over time (two experiments pooled, $n = 14$ per group). **(B)** Withdrawal signs following naloxone injection (subcutaneous 1 mg/kg) 2 hours after the last morphine administration ($n = 4$ mice/group). **(C)** Withdrawal signs measured following morphine reexposure (50 mg/kg) after either 1 or 4 weeks of abstinence ($n = 5$/group). Physical symptoms decreased after 4 weeks. **(D)** Corticosterone and adrenocorticotropin hormone (ACTH) levels measured in chronic and 4-week abstinent groups ($n = 5–6$ per group). The HPA axis was activated after chronic treatment but not after 4 weeks. Values are mean ± SEM. $^{*}p < .05$; $^{**}p < .01$; $^{***}p < .0001$ morphine vs. saline controls. $^{\#}p < .05$ comparison between 1- and 4-week abstinence groups within each treatment condition. CORT, corticosterone.

somatic symptoms induced by naloxone following a single morphine reinitiation (42), in animals exposed to chronic saline or morphine and maintained abstinent for 1 or 4 weeks ($n = 5$/group).

The number of wet-dog shakes and sniffing behaviors were affected by morphine treatment only [ANOVA: $F(1,16) = 28.0$; $p < .0001$, $F(1,16) = 18.0$; $p < .01$, respectively]. Post hoc analysis showed that previous exposure to morphine increased the number of shakes ($p < .01$) and sniffings ($p < .05$) at both time points. Two-way ANOVA revealed a main effect of morphine treatment [$F(1,16) = 16.1$; $p < .0001$] and time [$F(1,16) = 26.0$; $p < .0001$], as well as a significant interaction between these factors ($p < .0001$) on the number of jumps. Morphine-abstinent mice jumped significantly more than saline controls at the 1-week time point ($p < .0001$), and this difference was no longer significant after 4 weeks of abstinence ($p > .05$). The number of paw tremors were also affected by treatment [ANOVA: $F(1,16) = 18.3$ $p < .01$] and time [ANOVA: $F(1,16) = 5.6$; $p < .05$] and were more abundant in mice with a previous history of morphine after 1 ($p < .01$) and 4 weeks ($p < .05$) of abstinence. In addition, post hoc analysis showed that 4-week abstinent mice exhibited significantly less paw tremors and jumps than 1-week abstinent mice ($p < .05$). In conclusion, both jumping behavior and paw tremor parameters decrease with increasing abstinence duration, indicating that physical dependence attenuates as abstinence unfolds.

Corticosterone Decreases During Protracted Abstinence

To investigate the impact of the morphine regimen on stress systems, as well as the influence of the 4-week abstinence period, we measured plasmatic adrenocorticotropin hormone (ACTH) and corticosterone concentrations 2 hours after the last morphine injection or 4 weeks later (Figure 1D). Two-way ANOVA indicated that corticosterone concentration was affected by morphine treatment [$F(1,19) = 35.9$; $p < .0001$] as well as time [$F(1,19) = 40.2$; $p < .0001$] with a significant interaction between these factors ($p < .0001$). Chronic morphine injections increased corticosterone concentrations compared with saline-treated group ($p < .0001$), but this difference was no longer present in 4-week abstinent mice ($p > .05$). For ACTH, two-way ANOVA detected a main effect of treatment [$F(1,19) = 5.6$; $p < .05$] and time [$F(1,19) = 4.3$; $p < .05$], but post hoc analysis failed to reach statistical significance at each separate time point ($p > .05$). Altogether, corticosterone levels, and to a lesser extent ACTH levels, indicate that activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis was increased after the chronic morphine treatment but that this dysregulation was restored after 4 weeks (Figure 1D).

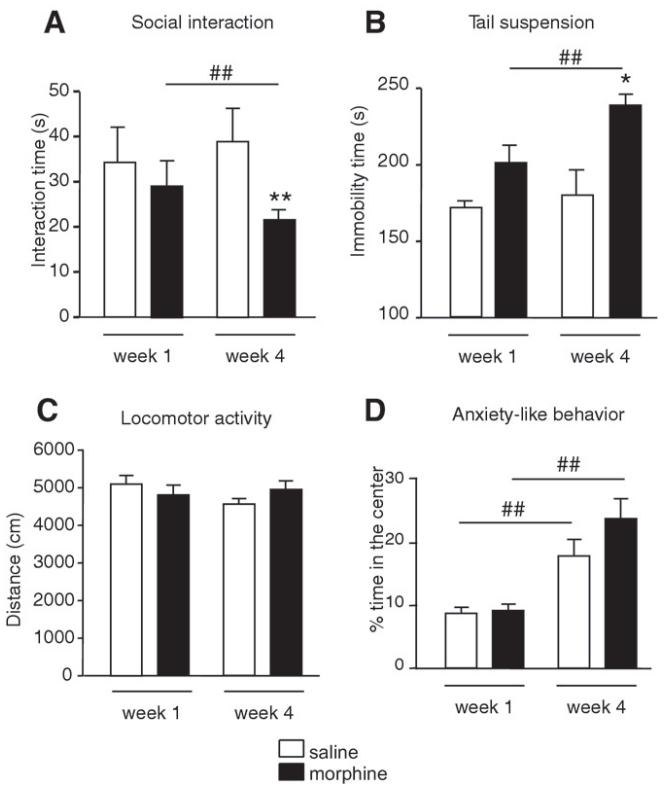


Figure 2. Social interaction deficits and depressive-like behavior develop during protracted abstinence. **(A)** Social interaction test. Social behaviors decreased after 4 weeks of abstinence. **(B)** Tail suspension test. Immobility duration increased after 4 weeks abstinence. **(C, D)** Open-field test. Morphine abstinence had no effect on **(C)** locomotor activity or **(D)** anxiety-like behavior. Values are mean ± SEM. * $p < .05$. ** $p < .01$ morphine vs. saline controls. ## $p < .01$ comparison between 1- and 4-week abstinence groups within each treatment condition ($n = 8$ per group).

Depressive-Like Behaviors Develop During Protracted Abstinence

Next we investigated emotional-like responses of morphine- or saline-exposed animals either 1 or 4 weeks after the chronic treatment.

First we assessed social interactions (Figure 2A). Two-way ANOVA showed that the total social exploration time between pairs of mice of same treatment group was affected by morphine preexposure [$F(1,14) = 9.0$; $p < .01$] and by the duration of abstinence [$F(1,14) = .1$; $p < .05$], and a significant interaction was detected between these factors ($p < .05$). Post hoc analysis revealed that morphine-treated pairs of mice interacted less than saline-treated pairs after the 4-week abstinence period ($p < .01$). This group also interacted less than the 1-week morphine-abstinent pairs ($p < .01$).

Second we evaluated despair behavior in the TST (Figure 2B). Two-way ANOVA detected a main effect of treatment [$F(1,28) = 4.4$; $p < .05$] and time [$F(1,28) = 16.4$; $p < .01$] on immobility time. Thus, morphine treatment significantly increased immobility at the 4-week time point only, compared with saline-treated counterparts ($p < .05$) and to 1-week morphine-abstinent mice ($p < .01$). Altogether, social interactions were impaired and despair behavior was enhanced after preexposure to chronic morphine. Importantly, these effects were strong only after a prolonged abstinence period.

Third, we examined locomotor activity and anxiety-like behaviors in the open-field test. Total distance traveled in the arena was influenced neither by previous morphine treatment [$F(1,28) = .1$; $p > .05$] nor by the duration of abstinence [$F(1,28) = .8$; $p > .05$, Figure 2C], indicating that behavioral modifications are not secondary to changes in activity. The percentage of time spent in the center of the arena did not differ between saline- and morphine-treated animals [$F(1,28) = 2.2$; $p > .05$; Figure 2D]. However, ANOVA detected a significant effect of abstinence time in both saline- and morphine-exposed groups [$F(1,28) = 31.0$; $p < .01$], which both spent less time in the center at the 1-week time point, compared to the 4 weeks time point ($p < .01$ for both groups, post hoc analysis).

Serotonin Turnover Is Increased in the Dorsal Raphe After 4 Weeks Abstinence

High-performance liquid chromatography analysis was conducted to determine 5-HT, 5-HT metabolite (5-HIAA), noradrenaline (NA), and dopamine (DA) levels in the PFC, HIPP, central amygdala (CeA), and DR, either 2 hours after the last morphine injection or 4 weeks later. All values are shown in Table 1. Two-way ANOVA was performed for each amine, in each structure. Statistical analysis of treatment and time effects and their interactions are summarized in Table 2. Post hoc analysis of amine contents indicates that chronic morphine, compared with chronic saline, altered 5-HT, but not NA or DA, concentration in the several limbic brain regions investigated; 5-HT concentrations were significantly reduced in PFC ($p < .05$), HIPP ($p < .05$), and CeA ($p < .01$) in morphine-treated mice. After 4 weeks of abstinence, concentrations were similar in groups previously exposed to morphine or saline, indicating recovery of aminergic transmission in all three regions ($p > .05$ for all). In the DR, however, a decrease was obvious in morphine-abstinent mice for both 5-HT and NA concentrations. This decrease was restricted to the DR ($p < .01$ for both 5-HT and NA), suggesting that long-term adaptations take place in this brain structure.

Because 5-HT content was most affected by morphine treatment, we analyzed 5-HT turnover, as a measure of serotonergic activity in chronic and abstinent conditions (Figure 3). In the PFC, two-way ANOVA revealed a main effect of treatment [$F(1,19) = 11.2$; $p < .01$] and time [$F(1,19) = 39.3$; $p < .0001$], with a significant interaction between factors ($p < .01$). Turnover of 5-HT was higher in the morphine-treated group compared with saline control group in the chronic condition only ($p < .0001$). In the HIPP, 5-HT turnover was also affected by morphine treatment [$F(1,19) = 3.9$; $p < .05$] and time [$F(1,19) = 8.4$; $p < .01$], with a significant between-factor interaction ($p < .05$). Post hoc analysis showed that chronic morphine treatment increased the turnover rate, compared with chronic saline treatment ($p < .01$). In the CeA, no effect of treatment [$F(1,19) = 3.6$; $p > .05$] or condition [$F(1,19) = 3.4$; $p > .05$] was detected, but a significant interaction between these factors [$F(1,19) = 12.8$; $p < .01$] was seen. Post hoc analysis showed that 5-HT turnover was enhanced following chronic morphine treatment ($p < .01$) and restored in the abstinent condition ($p > .05$). Finally, we examined the turnover in the DR, the main source of 5-HT in the brain. Two-way analysis of variance revealed a main effect of treatment [$F(1,19) = 10.6$; $p < .01$]. Post hoc analysis showed that 5-HT turnover was higher in morphine-treated groups compared with saline controls, although the effect was not significant in the chronic condition ($p < .05$). In contrast with limbic structures, high turnover rates were maintained throughout abstinence in morphine-treated animals and reached statistical significance in the abstinent condition (Figure 3D,p $< .01$). Together these data show major morphine-induced alterations of serotonergic activity in both limbic areas and brainstem. The data also indicate that these modifications evolve with time, decreasing in 5-HT neuron projections areas while strengthening at the level of 5-HT neurons.

Table 1. Bioamine Levels in the Forebrain and Brainstem Following Chronic Morphine Administration and Protracted Abstinence

	Prefrontal Cortex	Hippocampus	Central Amygdala	Dorsal Raphe
5-HT				
Sal—chronic	249.2 ± 16.9	486.4 ± 69.2	44.6 ± 6.6	9.6 ± 3.3
Mor—chronic	172.3 ± 10.0[a]	350.2 ± 37.6[a],[c]	28.0 ± 3.2[b]	7.0 ± 2.0
Sal—abstinent	244.8 ± 23.6	257.1± 17[d]	24.0 ± 3.5[d]	13.2 ± 1.7
Mor—abstinent	221.9 ± 45.6	283.6 ± 34.8	21.7 ± 3.3	5.4 ± 2.0[b]
NA				
Sal—chronic	279.9 ± 8.9	285.6 ± 46.3	24.2 ± 2.3	10.5 ± 2.1
Mor—chronic	265.8 ± 15.9	273.6 ± 8.4	24.1 ± 2.3	6.4 ± 1.6
Sal—abstinent	276.0 ± 22.8	280.3 ± 20.4	19.0 ± 2.8	23.8 ± 3.7[d]
Mor—abstinent	251.9 ± 44.7	191.5 ± 24.2	22.2 ± 4.4	8.7 ± 3.0[b]
Da				
Sal—chronic	102.1 ± 8.1	nd	148.8 ± 7.2	2.7 ± 1.0
Mor—chronic	95.1 ± 6.9	nd	135.0 ± 12.1	2.4 ± .6
Sal—abstinent	107.3 ± 12.2	nd	115.2 ± 12.4	3.4 ± .4
Mor—abstinent	89.0 ± 18.0	nd	110.3 ± 16.8	1.8 ± .6

Serotonin (5-HT), noradrenaline (NA), and dopamine (DA) concentrations (fmol/μg) were determined either 2 hour (chronic) or 4 weeks (abstinent) after chronic morphine (Mor) or saline (Sal) treatment. Chronic morphine significantly decreased 5-HT, but not NA or DA levels, in the prefrontal cortex, central amygdala and hippocampus. After 4 weeks of abstinence, 5-HT and NA levels were decreased in the dorsal raphe. Values represent mean ± SEM. For each structure, statistical significance was determined by two-way analysis of variance (cf. Table 2) followed by multiple group comparison when relevant. nd, not determined.

[a] $p < .05$ and

[b] $p < .01$, indicating morphine vs. saline comparison for each time point.

[c] $p < .05$ and

[d] $p < .01$, comparison between chronic and abstinent groups for each treatment ($n = 6$ per group).

Chronic Fluoxetine Administration Prevents the Development of Depressive-Like Deficits During Protracted Abstinence

We next examined effects of chronic fluoxetine treatment (FLX, 10 mg/kg/24h) along the abstinence period (see Supplemental Methods and Materials and Results in Supplement 1) to evaluate depressive features in the observed behavioral deficits and test whether enhancement of 5-HT function could prevent their incubation.

We first evaluated fluoxetine effect on locomotor activity. Neither previous morphine [$F(1,74) = .2$; $p > .05$] nor fluoxetine treatment [$F(1,74) = 3.3$; $p > .05$] affected total distance traveled in the open-field (saline/chow: 10,205 ± 321; morphine/chow: 10,226 ± 299; saline/FLX: 9686 ± 554 morphine/FLX: 9294 ± 381).

We then examined the effect of chronic fluoxetine treatment in mice previously exposed to saline or morphine on social (Figure 4A) and individual (Figure 4B) parameters in the social interaction test. Two-way ANOVA revealed that both morphine [$F(1,37) = 5.5$; $p < .05$] and fluoxetine [$F(1,37) = 5.8$; $p < .05$] modified social interaction time, with a significant interaction between treatments ($p < .05$). Consistent with our previous results (Figure 2A), morphine/chow pairs spent significantly less time interacting than saline/chow pairs in control groups ($p < .01$). Chronic fluoxetine administration fully prevented this morphine-induced deficit, because interaction times between pairs of morphine/FLX treated mice were significantly increased compared with the morphine/chow abstinent pairs ($p < .01$). During the social encounter, individual grooming was also modified by morphine treatment [$F(1,37) = 12.5$; $p < .01$], but not by fluoxetine [$F(1,37) = 3.4$; $p > .05$], although a significant interaction was detected between treatments (Figure 4B). Intergroup comparisons indicated that morphine-induced increase in individual grooming time in chow mice ($p < .01$) was reduced following fluoxetine treatment. Indeed, morphine/FLX groups exhibited less self-grooming behaviors than morphine/

Table 2. Summary of Two-Way Analysis of Variance of Bioamine Contents in the Brain, $n = 5–6$ per Group

	Prefrontal Cortex	Hippocampus	Central Amygdala	Dorsal Raphe
5-HT				
Treatment	4.1; < .05	5.3; < .05	4.3; < .05	4.5; < .05
Time	.7; ns	19.0; < .001	8.6; < .05	2; ns
Interaction	ns	ns	ns	ns
NA				
Treatment	.5; ns	3.0; ns	.3; ns	12.0; < .01
Time	.1; ns	2.2; ns	1.3; ns	7.9; < .05
Interaction	ns	ns	ns	< .05
DA				
Treatment	.4; ns	nd	1.9; ns	1.2; ns
Time	2.2; ns	nd	3.1; ns	.1; ns
Interaction	ns	nd	ns	ns

This analysis is based on data presented in Table 1. In each structure, two-way analysis of variance for treatment (morphine, saline) and time factors (chronic, abstinent) was performed. The table represents $F(1,19)$; p values for each factor, and p value for interaction between factors. In case of significant interaction or significant main effects, the results of post-hoc analysis are described in the text. nd, not determined; ns, nonsignificant.

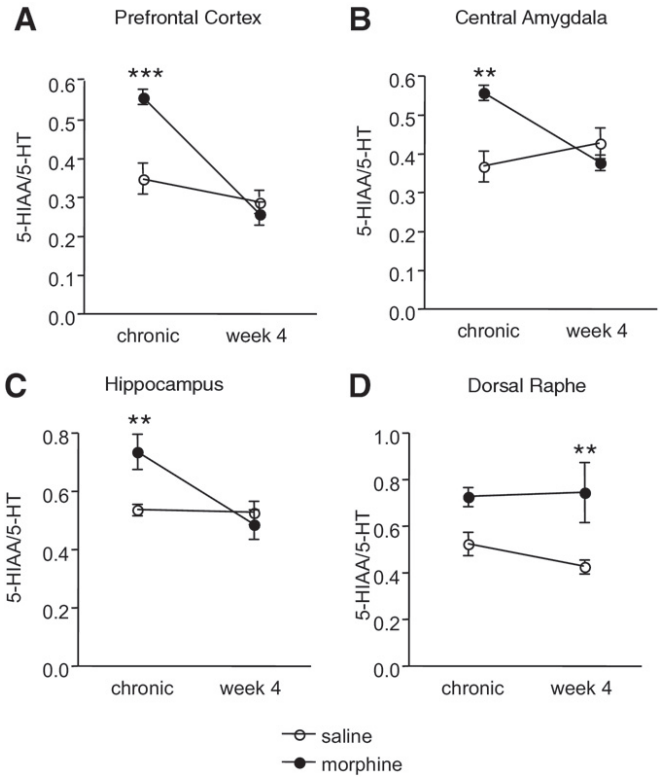


Figure 3. 5-hydroxytryptamine (5-HT) turnover is increased in the dorsal raphe after protracted abstinence. 5-HT turnover, defined as the 5-hydroxyindoleacetic acid/5-HT ratio, is shown. Chronic morphine treatment significantly increased 5-HT turnover in the **(A)** prefrontal cortex, **(B)** central amygdala, and **(C)** hippocampus, but not in the dorsal raphe **(D)**. After 4 weeks of abstinence, 5-HT turnover was increased specifically in the dorsal raphe. Values represent mean ± SEM. $^{**}p < .01$; $^{***}p < .001$ morphine vs. saline controls ($n = 5–6$ per group).

chow groups ($p < .05$). For this parameter, fluoxetine did not fully prevent the behavioral modification because morphine/FLX mice still spent more time self-grooming than the saline/FLX control group ($p < .05$).

We next investigated the effect of chronic fluoxetine treatment in the TST (Figure 4C and 4D). Two-way ANOVA detected a significant effect of fluoxetine [$F(1,74) = 3.9$; $p < .05$] on immobility time, as well as an interaction with previous exposure to morphine ($p < .05$). In accordance with our previous results (Figure 2A), morphine/chow mice showed higher immobility than saline/chow controls (Figure 4C, $p < .05$). Fluoxetine abolished this difference, so that morphine/FLX mice showed reduced immobility time compared with morphine/chow group ($p < .05$). Finally, high activity time was affected by both morphine [$F(1,74) = 4.9$; $p < .01$] and fluoxetine treatments [$F(1,74) = 8.2$; $p < .05$; Figure 4D]. Morphine/chow animals were less active compared with saline/chow controls ($p < .05$), and fluoxetine treatment normalized this effect, because active times no longer differed in morphine/FLX and saline/FLX groups after chronic fluoxetine treatment (Figure 4B, $p > .05$). Moreover, active time in morphine/FLX group was significantly increased compared with morphine/chow ($p < .01$).

Together these experiments indicate that fluoxetine administered during the 4-week abstinence period is able to prevent the development of aberrant social and despair-like behaviors.

Discussion

Opiate addiction and depression show a high degree of comorbidity (43-45). The lifetime prevalence of major depression is approximately 30% to 50% in postdependent subjects undergoing maintenance therapy (46,47). This strong association suggests that opiate abuse may induce depressive symptoms or, conversely, that depressed mood can contribute to drug abuse (9) in a self-medication hypothesis. In the latter case, antidepressants could contribute to alleviate both illnesses (48). Depression, when resulting from addiction, is observed long after acute aspects of withdrawal have dissipated and mood alterations are not reversed by opioid maintenance therapy, suggesting that long-term adaptive processes develop also outside the opioid system. At present, direct links between these two severe and frequent psychiatric disorders remain unclear and have been little studied in animal models.

In our model of morphine abstinence, we show that abstinent mice develop depressive-like deficits, which increase with the duration of abstinence, whereas sensitivity to naloxone-precipitated withdrawal declines. Early studies in the field failed to reveal increased sensitivity to precipitated withdrawal in postdependent animals (49,50), likely because of differences in methodology, led to the conclusion that relapse may result from psychological factors. Differences between physical and motivational aspects of acute withdrawal have since been well documented (51,52). Here we examined both physical withdrawal and emotional alterations during protracted abstinence and demonstrate a time-dependent dichotomy in the two processes.

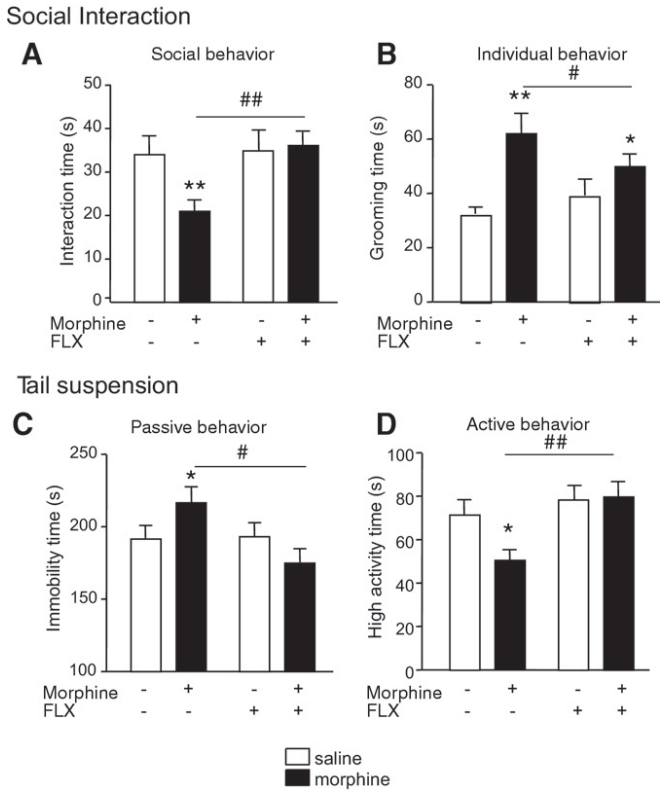


Figure 4. Fluoxetine prevents the development of depressive-like and social deficits. Social interaction test: Fluoxetine prevented protracted morphine effects on **(A)** social and (**B**) individual behaviors. Tail suspension test: fluoxetine also normalized passive **(C)** and active **(D)** behaviors in morphine abstinent animals. Values represent mean ± SEM. $^{*}p < .05$; $^{**}p < .01$ morphine vs. saline controls. $^{\#}p < .05$; $^{\#\#}p < .01$ comparison between morphine/chow and morphine/FLX groups ($n = 19–20$/group).

Thus, increased immobility in the TST appeared as a trend after 1 week of abstinence and became significant after 4 weeks. In this inescapable situation, enhanced immobility reflects a passive coping strategy associated with resignation, a behavioral measure of emotional despair (53). Concurrently, low sociability, reflected by reduced sniffing, following, and contact between pairs of mice, became evident during protracted abstinence. At 4 weeks, mice also exhibited a strong increase in self-grooming behavior, executed in a stereotyped and incomplete sequence that could reflect displacement behavior, a compulsive-type behavior to avoid coping (54). Similar social interaction deficits were reported in rats submitted to a chronic mild stress model (55) in the absence of anxiety-like behavior, further supporting this behavioral alteration as a relevant readout for reduced social interest in animal models of depression. Thus, our results highlight the emergence of gradual social withdrawal that parallels the development of despair behaviors in animals experiencing protracted morphine abstinence.

It could be argued here that decreased social interaction may also result from increased levels of anxiety, but this seems unlikely under our experimental conditions. We deliberately used low light and familiar conditions that are not expected to generate anxiety (56,57). In addition, anxiety-related behaviors assessed in the open-field test and independently confirmed in the light–dark test, were comparable between saline- and morphine-treated groups after 4 weeks of abstinence. It should be noted that heightened anxiety level was observed in both saline- and morphine-treated animals at the 1-week time point. However, this anxiogenic-like effect did not influence social or despair behaviors, because saline-treated mice showed similar social interaction times and immobility in the TST at both time points. This may result from an anxiogenic-like consequence of the twice-daily intraperitoneal injection protocol still detectable 1 week later but is nonetheless unrelated to morphine treatment per se. Thus, in our conditions, protracted morphine abstinence does not seem to involve a major modification of basal anxiety.

Abnormal HPA axis activity has been reported in postdependent heroin addicts (58,59). Recent clinical studies have shown that HPA activity and anxiety, but not negative mood ratings, could be normalized by opiate maintenance treatment, suggesting that depressive-like symptoms and basal HPA axis are not necessarily associated during abstinence (60). In accordance with previous studies, we found a transient increase in corticosterone levels after the last morphine injection (61) that normalized after 4 weeks, indicating that HPA axis activity was dissociable from depressive-like symptoms in our model. This transient corticosterone increase could nonetheless contribute to the setting of depressive-like behavior during protracted abstinent by triggering neuroadaptations in extrahypothalamic neuropeptide stress circuits (3,24,25,62,63) or by influencing the serotonergic tone at the presynaptic DR level or in forebrain projection structures (64).

We found that total NA and DA contents are not altered following chronic morphine treatment, whereas 5-HT concentrations are significantly reduced in PFC, HIPP, and DR. Interestingly, clinical studies in heroin addicts have also shown specific 5-HT activity deficiencies, in contrast to normal DA and NA function, with more profound changes in subjects having comorbid affective disorders (65). In our study, 5-HT content and turnover rates returned to control levels after the 4-week abstinence period in all three limbic regions. Notably, at this time point, 5-HT turnover was increased relative to saline-treated control group in the DR, a brain structure from which 5-HT neurons originate. Although measures of both intra- and extracellular 5-HT contents do not explain the exact nature of 5-HT activity alterations in the DR, our results clearly indicate that aberrant 5-HT activity persists and incubates during morphine abstinence.

Chronic morphine triggers broad adaptations at synaptic and transcriptional levels, which have been mainly investigated in mesocorticolimbic reward circuits (66-69) and affect monoaminergic function (70-72). Our data confirm that neuroplasticity takes place within 5-HT system in response to chronic morphine and reveal that 5-HT dysfunction evolves after cessation of drug exposure and persists for extended period during protracted abstinence. Within this line, a key finding of our study is that both enhanced despair behaviors and decreased social interest were normalized by chronic fluoxetine administration. Importantly, fluoxetine did not affect despair or social-related behaviors of control animals, demonstrating that treatment with the antidepressant drug specifically influenced long-term neuroadaptations, which result from chronic exposure to morphine and incubate during abstinence. Antidepressant therapies acutely enhance 5-HT, an effect thought to be responsible for neuroplastic changes in the brain. These, in turn, may restore functional alterations in corticolimbic circuits and reverse behavioral depressive-like symptoms (73,74). Together, therefore, our observations strongly support the notion that 5-HT function is altered in protracted abstinence to morphine. We suggest that neuroplasticity within 5-HT systems is a major mechanism contributing to the development of mood-related deficits in opiate abstinence.

In conclusion, this study establishes a direct connection between protracted abstinence to opiates and depressive-like symptoms in mice. The data strongly suggest a causal effect of serotonergic dysfunction in mood disruption. Future studies using mouse models should help clarify the molecular basis of long-term 5-HT neuroadaptations in morphine abstinence.

We thank the Mouse Clinical Institute (Illkirch, France)—in particular, Marie-France Champy for biochemical analysis, David Reiss for technical assistance, and Valérie Simmoneaux (Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, University of Strasbourg) for help with high-performance liquid chromatography analysis. We also thank Katia Befort for manuscript corrections and submission. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, and Université de Strasbourg. We thank the European Union (Grant No. GENADDICT/FP6 005166), the Fondation de la Recherche Médicale (CG), and the National Institutes of Health (Grant No. NIAAA AA-16658 and NIDA DA-16768) for financial support. Dr. Goeldner is currently affiliated with F. Hoffmann-La Roche Ltd., Discovery Research, Basel, Switzerland.

All authors report no biomedical financial interest or potential conflicts of interest.

Supplementary material cited in this article is available online.

1. Everitt BJ, Robbins TW (2005): Neural systems of reinforcement for drug addiction: From actions to habits to compulsion. *Nat Neurosci* 8:1481–1489.
2. Hyman SE, Malenka RC, Nestler EJ (2006): Neural mechanisms of addiction: The role of reward-related learning and memory. *Annu Rev Neurosci* 29:565–598.
3. Koob GF, Le Moal M (2008): Review. Neurobiological mechanisms for opponent motivational processes in addiction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363:3113–3123.
4. Shaham Y, Hope BT (2005): The role of neuroadaptations in relapse to drug seeking. *Nat Neurosci* 8:1437–1439.
5. Koob GF, Volkow ND (2010): Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology* 35:217–238.

6. Schulteis G, Koob GF (1996): Reinforcement processes in opiate addiction: A homeostatic model. *Neurochem Res* 21:1437–1454.
7. Jaffe JH (1990): Trivializing dependence. *Br J Addict* 85:1425–1427; discussion: 1429–1431.
8. Martin WR, Jasinski DR (1969): Physiological parameters of morphine dependence in man—Tolerance, early abstinence, protracted abstinence. *J Psychiatr Res* 7:9–17.
9. Cerda M, Sagdeo A, Galea S (2008): Comorbid forms of psychopathology: Key patterns and future research directions. *Epidemiol Rev* 30:155–177.
10. Kosten TR, Rounsaville BJ, Kleber HD (1986): A. 2.5-year follow-up of depression, life crises, and treatment effects on abstinence among opioid addicts. *Arch Gen Psychiatry* 43:733–738.
11. Harris GC, Aston-Jones G (2003): Altered motivation and learning following opiate withdrawal: Evidence for prolonged dysregulation of reward processing. *Neuropsychopharmacology* 28:865–871.
12. Lieblich I, Yirmiya R, Liebeskind JC (1991): Intake of and preference for sweet solutions are attenuated in morphine-withdrawn rats. *Behav Neurosci* 105:965–970.
13. Zhang D, Zhou X, Wang X, Xiang X, Chen H, Hao W (2007): Morphine withdrawal decreases responding reinforced by sucrose self-administration in progressive ratio. *Addict Biol* 12:152–157.
14. Aston-Jones G, Harris GC (2004): Review—brain substrates for increased drug seeking during protracted withdrawal. *Neuropharmacology* 47(suppl 1):167–179.
15. Sakoori K, Murphy NP (2005): Maintenance of conditioned place preferences and aversion in C57BL6 mice: Effects of repeated and drug state testing. *Behav Brain Res* 160:34–43.
16. Wikler A, Pescor FT (1970): Persistence of "relapse-tendencies" of rats previously made physically dependent on morphine. *Psychopharmacologia* 16:375–384.
17. Blatchford KE, Diamond K, Westbrook RF, McNally GP (2005): Increased vulnerability to stress following opiate exposures: Behavioral and autonomic correlates. *Behav Neurosci* 119:1034–1041.
18. Blatchford KE, Choi EA, McNally GP (2006): Altered responsivity to central administrations of corticotropin-releasing factor in rats with a history of opiate exposures. *Behav Neurosci* 120:1169–1174.
19. Harris GC, Aston-Jones G (1993): Beta-adrenergic antagonists attenuate withdrawal anxiety in cocaine- and morphine-dependent rats. *Psychopharmacology* 113:131–136.
20. Harris GC, Aston-Jones G (2001): Augmented accumbal serotonin levels decrease the preference for a morphine associated environment during withdrawal. *Neuropsychopharmacology* 24:75–85.
21. Anraku T, Ikegaya Y, Matsuki N, Nishiyama N (2001): Withdrawal from chronic morphine administration causes prolonged enhancement of immobility in rat forced swimming test. *Psychopharmacology* 157:217–220.
22. Molina VA, Heyser CJ, Spear LP (1994): Chronic variable stress or chronic morphine facilitates immobility in a forced swim test: Reversal by naloxone. *Psychopharmacology* 114:433–440.
23. Grasing K, Ghosh S (1998): Selegiline prevents long-term changes in dopamine efflux and stress immobility during the second and third weeks of abstinence following opiate withdrawal. *Neuropharmacology* 37:1007–1017.
24. Koob G, Kreek MJ (2007): Stress, dysregulation of drug reward pathways, and the transition to drug dependence. *Am J Psychiatry* 164:1149–1159.
25. Koob GF (2008): A role for brain stress systems in addiction. *Neuron* 59:11–34.
26. Maldonado R (1997): Participation of noradrenergic pathways in the expression of opiate withdrawal: Biochemical and pharmacological evidence. *Neurosci Biobehav Rev* 21:91–104.
27. Tassin JP (2008): Uncoupling between noradrenergic and serotonergic neurons as a molecular basis of stable changes in behavior induced by repeated drugs of abuse. *Biochem Pharmacol* 75:85–97.
28. Fadda P, Scherma M, Fresu A, Collu M, Fratta W (2005): Dopamine and serotonin release in dorsal striatum and nucleus accumbens is differentially modulated by morphine in DBA/2J and C57BL/6J mice. *Synapse* 56:29–38.
29. Tao R, Auerbach SB (1995): Involvement of the dorsal raphe but not median raphe nucleus in morphine-induced increases in serotonin release in the rat forebrain. *Neuroscience* 68:553–561.
30. Zhao ZQ, Gao YJ, Sun YG, Zhao CS, Gereau RWt, Chen ZF (2007): Central serotonergic neurons are differentially required for opioid analgesia but not for morphine tolerance or morphine reward. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:14519–14524.
31. Caille S, Espejo EF, Koob GF, Stinus L (2002): Dorsal and median raphe serotonergic system lesion does not alter the opiate withdrawal syndrome. *Pharmacol Biochem Behav* 72:979–986.
32. Alaei H, Pourshanazari AA, Rafati A (2002): Electrical stimulation of nucleus raphe dorsalis changes morphine self-administration and withdrawal symptoms in rats. *Pathophysiology* 9:1.
33. Akaoka H, Aston-Jones G (1993): Indirect serotonergic agonists attenuate neuronal opiate withdrawal. *Neuroscience* 54:561–565.
34. Wu CC, Chen JY, Tao PL, Chen YA, Yeh GC (2005): Serotonin reuptake inhibitors attenuate morphine withdrawal syndrome in neonatal rats passively exposed to morphine. *Eur J Pharmacol* 512:37–42.
35. Gray AM (2002): The effect of fluvoxamine and sertraline on the opioid withdrawal syndrome: A combined in vivo cerebral microdialysis and behavioural study. *Eur Neuropsychopharmacol* 12:245–254.
36. Singh VP, Jain NK, Kulkarni SK (2003): Fluoxetine suppresses morphine tolerance and dependence: Modulation of NO-cGMP/da/serotoninergic pathways. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 25:273–280.
37. Rafieian-Kopaei M, Gray AM, Spencer PS, Sewell RD (1995): Contrasting actions of acute or chronic paroxetine and fluvoxamine on morphine withdrawal-induced place conditioning. *Eur J Pharmacol* 275:185–189.
38. Contet C, Filliol D, Matifas A, Kieffer BL (2008): Morphine-induced analgesic tolerance, locomotor sensitization and physical dependence do not require modification of Mu Opioid receptor, cdk5 and adenylate cyclase activity. *Neuropharmacology* 54:475–486.
39. Matthes HW, Maldonado R, Simonin F, Valverde O, Slowe S, Kitchen I, *et al.* (1996): Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature* 383:819–823.
40. Ouagazzal AM, Kenny PJ, File SE (1999): Stimulation of nicotinic receptors in the lateral septal nucleus increases anxiety. *Eur J Neurosci* 11: 3957–3962.
41. Kest B, Palmese CA, Hopkins E, Adler M, Juni A (2001): Assessment of acute and chronic morphine dependence in male and female mice. *Pharmacol Biochem Behav* 70:149–156.
42. Brase DA, Iwamoto ET, Loh HH, Way EL (1975): Sensitization of mice to naloxone induced jumping after a single narcotic injection: Effect of prior physical dependence. *Proc West Pharmacol Soc* 18:294–297.
43. Brooner RK, King VL, Kidorf M, Schmidt CW Jr, Bigelow GE (1997): Psychiatric and substance use comorbidity among treatment-seeking opioid abusers. *Arch Gen Psychiatry* 54:71–80.
44. Darke S, Mills K, Teesson M, Ross J, Williamson A, Havard A (2009): Patterns of major depression and drug-related problems amongst heroin users across 36 months. *Psychiatry Res* 166:7–14.
45. Teesson M, Havard A, Fairbairn S, Ross J, Lynskey M, Darke S (2005): Depression among entrants to treatment for heroin dependence in the Australian Treatment Outcome Study (ATOS): Prevalence, correlates and treatment seeking. *Drug Alcohol Depend* 78:309–315.
46. Nunes EV, Sullivan MA, Levin FR (2004): Treatment of depression in patients with opiate dependence. *Biol Psychiatry* 56:793–802.
47. Peles E, Schreiber S, Naumovsky Y, Adelson M (2007): Depression in methadone maintenance treatment patients: Rate and risk factors. *J Affect Disord* 99:213–220.
48. Nunes EV, Quitkin FM, Donovan SJ, Deliyannides D, Ocepek-Welikson K, Koenig T, *et al.* (1998): Imipramine treatment of opiate-dependent patients with depressive disorders. A placebo-controlled trial. *Arch Gen Psychiatry* 55:153–160.
49. Cheney DL, Goldstein A (1971): Tolerance to opioid narcotics: Time course and reversibility of physical dependence in mice. *Nature* 232: 477–478.
50. Wei E, Loh H (1972): Morphine physical dependence unaltered by previous dependence on morphine. *Nature* 238:396–397.
51. Frenois F, Cador M, Caille S, Stinus L, Le Moine C (2002): Neural correlates of the motivational and somatic components of naloxone-precipitated morphine withdrawal. *Eur J Neurosci* 16:1377–1389.
52. Koob GF, Maldonado R, Stinus L (1992): Neural substrates of opiate withdrawal. *Trends Neurosci* 15:186–191.
53. Cryan JF, Holmes A (2005): The ascent of mouse: Advances in modelling human depression and anxiety. *Nat Rev Drug Discov* 4:775–790.
54. Kalueff AV, Tuohimaa P (2005): The grooming analysis algorithm discriminates between different levels of anxiety in rats: Potential utility for neurobehavioral stress research. *J Neurosci Methods* 143:169–177.

55. Kompagne H, Bardos G, Szenasi G, Gacsalyi I, Harsing LG, Levay G (2008): Chronic mild stress generates clear depressive but ambiguous anxiety-like behaviour in rats. *Behav Brain Res* 193:311–314.
56. File SE, Kenny PJ, Ouagazzal AM (1998): Bimodal modulation by nicotine of anxiety in the social interaction test: Role of the dorsal hippocampus. *Behav Neurosci* 112:1423–1429.
57. File SE, Seth P (2003): A review of 25 years of the social interaction test. *Eur J Pharmacol* 463:35–53.
58. Li SX, Li J, Epstein DH, Zhang XY, Kosten TR, Lu L (2008): Serum cortisol secretion during heroin abstinence is elevated only nocturnally. *Am J Drug Alcohol Abus* 34:321–328.
59. Zhang GF, Ren YP, Sheng LX, Chi Y, Du WJ, Guo S, *et al.* (2008): Dysfunction of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in opioid dependent subjects: Effects of acute and protracted abstinence. *Am J Drug Alcohol Abus* 34:760–768.
60. Kakko J, von Wachenfeldt J, Svanborg KD, Lidstrom J, Barr CS, Heilig M (2008): Mood and neuroendocrine response to a chemical stressor, metyrapone, in buprenorphine-maintained heroin dependence. *Biol Psychiatry* 63:172–177.
61. Houshyar H, Gomez F, Manalo S, Bhargava A, Dallman MF (2003): Intermittent morphine administration induces dependence and is a chronic stressor in rats. *Neuropsychopharmacology* 28:1960–1972.
62. Koob GF (2010): The role of CRF and CRF-related peptides in the dark side of addiction. *Brain Res* 1314:3–14.
63. Zhou Y, Proudnikov D, Yuferov V, Kreek MJ (2010): Drug-induced and genetic alterations in stress-responsive systems: Implications for specific addictive diseases. *Brain Res* 1314:1314C:235–252.
64. Lanfumey L, Mongeau R, Cohen-Salmon C, Hamon M (2008): Corticosteroid-serotonin interactions in the neurobiological mechanisms of stress-related disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 32:1174–1184.
65. Gerra G, Zaimovic A, Timpano M, Zambelli U, Begarani M, Marzocchi GF, *et al.* (2000): Neuroendocrine correlates of temperament traits in abstinent opiate addicts. *J Subst Abus* 11:337–354.
66. Ammon-Treiber S, Hollt V (2005): Morphine-induced changes of gene expression in the brain. *Addict Biol* 10:81–89.
67. Befort K, Filliol D, Darcq E, Ghate A, Matifas A, Lardenois A, *et al.* (2008): Gene expression is altered in the lateral hypothalamus upon activation of the mu opioid receptor. *Ann NY Acad Sci* 1129:175–184.
68. Befort K, Filliol D, Ghate A, Darcq E, Matifas A, Muller J, *et al.* (2008): mu-opioid receptor activation induces transcriptional plasticity in the central extended amygdala. *Eur J Neurosci* 27:2973–2984.
69. McClung CA, Nestler EJ, Zachariou V (2005): Regulation of gene expression by chronic morphine and morphine withdrawal in the locus ceruleus and ventral tegmental area. *J Neurosci* 25:6005–6015.
70. Lanteri C, Salomon L, Torrens Y, Glowinski J, Tassin JP (2008): Drugs of abuse specifically sensitize noradrenergic and serotonergic neurons via a non-dopaminergic mechanism. *Neuropsychopharmacology* 33:1724–1734.
71. Sastre-Coll A, Esteban S, Garcia-Sevilla JA (2002): Supersensitivity of 5-HT1A autoreceptors and alpha2-adrenoceptors regulating monoamine synthesis in the brain of morphine-dependent rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 365:210–219.
72. Smith RJ, Aston-Jones G (2008): Noradrenergic transmission in the extended amygdala: Role in increased drug-seeking and relapse during protracted drug abstinence. *Brain Struct Funct* 213:43–61.
73. Berton O, Nestler EJ (2006): New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat Rev Neurosci* 7:137–151.
74. D'Sa C, Duman RS (2002): Antidepressants and neuroplasticity. *Bipolar Disord* 4:183–194.

Supplement 1

Supplemental Methods and Materials

Behavioral testing

Open field. Mice were placed for 30 min in 44 x 44 cm open-field arenas (Panlab, Barcelona, Spain), fitted with infra-red beams allowing automated locomotor activity measures (Actitrack, Barcelona, Spain). Arenas were indirectly lit (150 lux) for locomotor activity and anxiety measures. Distance and time spent in the center were recorded during the first 15 min. This exposition to the open-field served as habituation to the environment of the social interaction test.

Social interaction. Pairs of mice of same treatment condition and weight, but from different homecages, were placed simultaneously in the arena, indirectly lit at 50 lux for 10 min (adapted from (1)). Using an ethological keyboard, the time spent (s) grooming, sniffing, following or in physical contact with the partner was scored as social behaviors. Conversely, the time spent (s) self-grooming was scored as individual behavior.

Tail suspension test (TST). Mice were suspended by the tail 50 cm above the floor. Activity was automatically monitored for 6 min, in 2-min periods (MED Associates Inc, St Albans, VT), as previously described (2). An upper and a lower threshold defined struggling (active) and immobility (passive) behaviors, respectively.

Light-dark test. The apparatus consisted of two identical boxes (20 x 20 x 14 cm) interconnected with a dark tunnel (5 x 7 x 10 cm, Imetronic, Pessac, France) equipped with infrared sensors. The light compartment (white walls) was brightly illuminated (1900 lux) from the ceiling. Mice were placed in the dark compartment (black walls) and the total time spent, as well as the number of entries in each compartment were recorded for 5 min.

Fluoxetine supplementation in chow pellets

The amount of fluoxetine (Sigma-Aldrich, Lyon, France) supplemented to regular chow powder was based upon initial body weight of animals and daily average food intake. For example, a 30 g mouse consuming 4 g/day (dry weight) of chow supplemented with 0.3 mg fluoxetine received an approximate 10 mg/kg/24h dose. Appropriate amount of fluoxetine was dissolved in drinking water (600 ml) and then thoroughly mixed with regular chow powder (1 Kg, Safe R04, Augy, France) until a homogenous “dough” was obtained. Pellets

were formed and frozen at -20°C overnight. The chow pellets were then lyophilized for 48 h and stored at 4°C before use. Lyophilization allows monitoring of dry weight food intake during experiments, by weighing remaining pellets in feeder. All groups of mice were habituated to control lyophilized chow (0 mg/kg fluoxetine) for 1 week before experiments, during which their daily food intake was measured.

Because of potential differences in food intake of group-housed animals, the fluoxetine dose may vary from one animal to another. However after 4 weeks of per os administration, no direct correlation was found between behavioral effects (immobility and high-activity scores in the tail suspension test) of fluoxetine and food intake as indexed by body weights (data not shown). Hence, potential inter-individual differences in food intake do not translate into differential behavioral effects of fluoxetine under our experimental conditions.

Biochemical analysis

Radioimmunoassay for adrenocorticotropic hormone (ACTH) and corticosterone plasma levels measurements. Mice were decapitated and trunk blood was collected, immediately placed on ice, then centrifuged 15 min at 1500 RCF at 4°C. Plasma was separated and stored at -20°C. ACTH and corticosterone measurements were assayed in duplicates, using 125I RIA kits (MP Biomedicals, Illkirch, France), following manufacturer instructions.

Neurochemical assay for biogenic amines measurements. Brain regions (prefrontal cortex (PFC), hippocampus (HIPP), central amygdala (CeA) and dorsal raphe nucleus (DR)) were bilaterally micro-dissected using tissue corer and brain matrix (ASI Instruments, Warren, MI) as previously described (3). Brain punches were homogenized by ultrasonication in a cold 0.4 M HClO4, 0.4 mM sodium metabisulfite and 1 mM EDTA solution, centrifuged (15700 RCF, 5 min) and supernatants analyzed for 5-HT, 5-HT metabolite (5-hydroxyindoleacetic acid, 5-HIAA), noradrenaline (NA) and dopamine (DA) contents. High performance liquid chromatography with amperometric electrochemical detection (HPLC/ED, Decade Antec, Leiden, The Netherlands) was used. The electrochemical flowcell detector consisted of an Ag/AgCl electrode versus carbon electrode configuration. The working potential was 0.6 V and the range of sensitivity was 0.5 nA and the working temperature was 35°C. Each 20 µl sample was injected on the column (Ultrasphere ODS 3µ 80A, 750 x 4.6 mm, Beckman, Fullerton, CA). For the isocratic separation, flow rate was 0.8 ml/min and each analysis lasted 65 min. Data is acquired using

Azur v4.5 software (Datalys, St Martin d'Hères, France) and is expressed in moles/µg of total protein for each 20 µl sample, after total protein content determination (Lowry method).

Supplemental Results

Pilot fluoxetine dose-response experiment

Fluoxetine (0-30 mg/kg/24h) was supplemented in food for 3 weeks, and food intake was monitored per cage (n = 8 mice/dose, i.e., n = 2 cages/dose) twice a week to avoid excessive food handling (Figure S1A). Both chronic fluoxetine treatment ($F(1,3) = 20.0$; $p < 0.01$) and duration of treatment ($F(1,5) = 28.2$; $p < 0.01$) affected food intake with a significant interaction between factors ($p < 0.0001$). Post-hoc analysis following ANOVA of fluoxetine effect, at each separate time point, showed that the 30 mg/kg dose reduced food intake at week 2 (day 8, $p < 0.05$; day 11, $p < 0.05$) and week 3 (day 15, $p < 0.01$; day 18, $p < 0.0001$) compared to control group. The 3 mg/kg dose transiently increased food intake at day 11 ($p < 0.05$). Note that the 10 mg/kg dose did not alter food intake during the 3 weeks of treatment. Following 3 weeks of fluoxetine treatment, mice were tested drug free in the tail suspension test (Figure S1B). Fluoxetine treatment affected immobility time (ANOVA $F(1,3) = 4.8$, $p < 0.05$), and the 30 mg/kg dose significantly reduced immobility compared to control ($p < 0.05$) and to the 3 mg/kg dose ($p < 0.01$).

The 10 mg/kg was thus chosen as it did not alter food intake during the 3 weeks of treatment and was ineffective on despair-related behaviors in naïve mice. The 30 mg/kg dose was rejected as it severely reduced food intake, and several animals showed typical serotonergic overdosage symptoms (paw tremors, convulsions after TST). Compared to studies using repeated antidepressant injections, this oral administration protocol is unlikely to be stressful.

Anxiety-like behavior in 4-week abstinent mice

An independent group of mice was injected with morphine (n = 10) or saline (n = 10) and tested in the light-dark test 4 weeks later. Previous morphine exposure did not modify exploratory behavior (Figure S2A: total number of entries, t-test $p > 0.05$) nor anxiety-like behaviors, as both number of entries in lit compartment (Figure S2B: $p > 0.05$) and the % of time spent in the lit compartment (Figure S2C: t-test, $p > 0.05$) were similar between morphine and saline-treated groups.

These results are in accordance with the open-field test (Figure 2D) and confirm that 4-week abstinent mice do not show any morphine-induced anxiety-like behaviors.

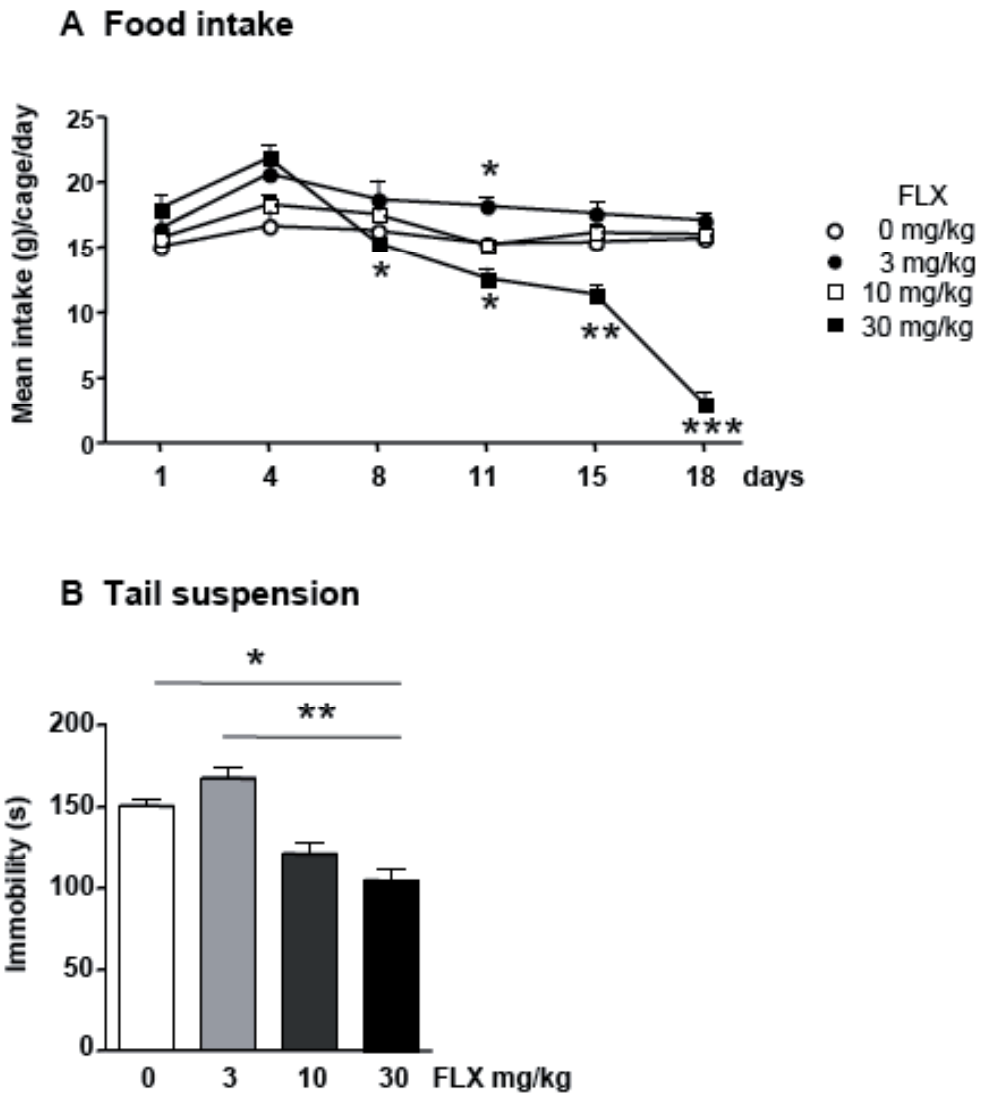


Figure S1. Three weeks of fluoxetine (supplementation in chow, 0, 3, 10, 30 mg/kg/24h FLX, see above) affects food intake **(A)** and immobility in the tail suspension test **(B)**. Values are mean ± SEM (n = 8/group). The 10 mg/kg dose did not significantly modify food intake or despair behavior, and was therefore chosen in the abstinence experiments. **(A)** *$p < 0.05$; **$p < 0.01$; ***$p < 0.0001$ fluoxetine versus control group. **(B)** *$p < 0.05$ fluoxetine 30 mg/kg versus control group; $^{**}p < 0.01$ fluoxetine 30 mg/kg versus fluoxetine 3 mg/kg.

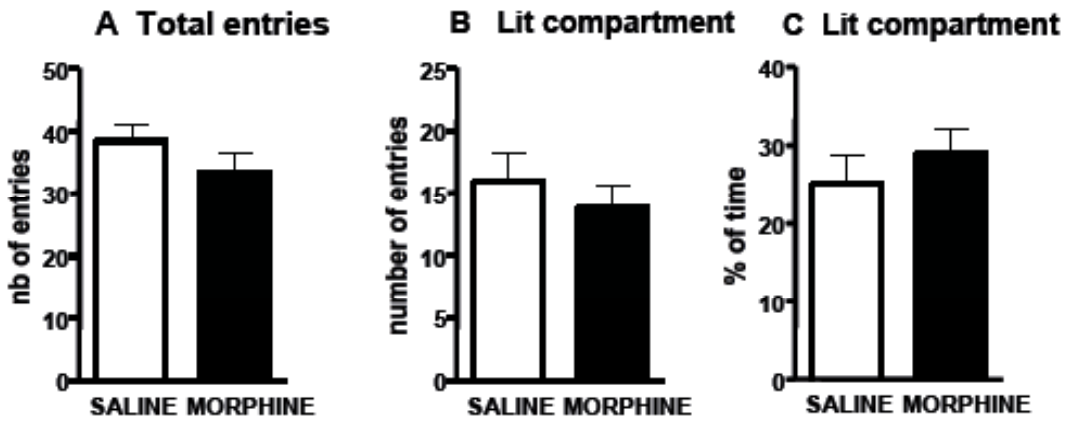


Figure S2. Anxiety-like behavior in 4-week abstinent mice in the light-dark test. **(A)** Total entries in both compartments, **(B)** number of entries and **(C)** % of time spent in the lit compartment. Pre-exposure to morphine did not modify anxiety-related responses in this test.

Supplemental References

1. File SE, Seth P (2003): A review of 25 years of the social interaction test. *Eur J Pharmacol* 463: 35-53.
2. Goeldner C, Reiss D, Kieffer BL, Ouagazzal AM (2010): Endogenous nociceptin/orphanin-FQ in the dorsal hippocampus facilitates despair-related behavior. *Hippocampus* 20: 911-6.
3. Befort K, Filliol D, Ghate A, Darcq E, Matifas A, Muller J, *et al.* (2008): Mu-opioid receptor activation induces transcriptional plasticity in the central extended amygdala. *Eur J Neurosci* 27: 2973-2984.

ARTICLE 3

Sequential and opposing alterations of 5-HT1A receptor function during withdrawal from chronic morphine.

Lutz PE, Pradhan AA, Goeldner C, Kieffer BL.
European Neuropsychopharmacology (2011) 21:835-840.

European Neuropsychopharmacology (2011) 21, 835–840

www.elsevier.com/locate/euroneuro

SHORT COMMUNICATION

Sequential and opposing alterations of 5-HT$_{1A}$ receptor function during withdrawal from chronic morphine

Pierre-Eric Lutz, Amynah A. Pradhan [1], Celia Goeldner [2], Brigitte L. Kieffer*

Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Université de Strasbourg, 1 Rue Laurent Fries, 67404 Illkirch, France

Received 10 September 2010; received in revised form 3 February 2011; accepted 10 February 2011

KEYWORDS
Addiction;
5-HT$_{1A}$ receptor;
Autoradiography;
Mouse;
Dorsal raphe nucleus;
Medial prefrontal cortex

Abstract

Addiction is a brain chronic relapsing disorder associated with emotional distress. The serotonergic system and especially the 5-HT$_{1A}$ receptor crucially regulate emotional behaviors both in humans and rodents. Using [^{35}S]GTPγS autoradiography in mice, we show that 5-HT$_{1A}$ receptor function is enhanced by chronic morphine treatment in the medial prefrontal cortex, and decreased in dorsal raphe nucleus one week later, two regions involved in emotional processing. These molecular adaptations could contribute to the development of emotional disorders experienced by former opiate addicts.
© 2011 Elsevier B.V. and ECNP. All rights reserved.

1. Introduction

Serotonergic neurons, mainly located in the dorsal raphe nucleus (DRN), send axonal projections throughout the brain where serotonin (5-HT) release activates several 5-HT receptors. The 5-HT$_{1A}$ receptor (5-HT$_{1A}$R), a seven transmembrane domain receptor coupled to G$_{i/o}$ proteins (Pucadyil et al., 2005), has been identified as a key player in emotions. Functional imaging reveals its implication in the pathophysiology of depression in humans (Parsey et al., 2006), and buspirone, a classical 5-HT$_{1A}$R agonist, is used as an anxiolytic (Goodman, 2004). This receptor is strongly expressed both in the DRN and the medial prefrontal cortex (mPFC), two limbic regions implicated in emotional responses. Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI) are recognized as first-line antidepressants, and their effects have been correlated with 5-HT$_{1A}$R desensitization in DRN (Hensler, 2003; Savitz et al., 2009). In mice, the 5-HT$_{1A}$R gene knock-out (Ramboz et al., 1998) or reduced 5-HT$_{1A}$R expression in the DRN (Richardson-Jones et al., 2010) decreases behavioral despair.

* Corresponding author at: IGBMC Dpt Neurobiology and Genetics, Parc d'innovation, 1 rue Laurent Fries, 67404 Illkirch Cedex, France. Tel.: +33 0 3 88 65 56 93; fax: +33 0 3 88 65 56 04.
E-mail address: briki@igbmc.fr (B.L. Kieffer).
[1] Present address: Dept. of Psychiatry and Biobehavioral Sciences, David Geffen Sch. of Med., UCLA, Los Angeles, CA, USA.
[2] Present address: CNS Discovery Research, Behavioral Biology, F. Hoffmann-La Roche Ltd., Discovery Research CNS, CH-4070 Basel, Switzerland.

0924-977X/$ - see front matter © 2011 Elsevier B.V. and ECNP. All rights reserved.
doi:10.1016/j.euroneuro.2011.02.002

Opiate addiction is associated with emotional distress. Acute withdrawal, defined when access to the drug is prevented, produces physical symptoms and a negative affect (Koob and Volkow, 2010). After prolonged periods` of withdrawal, opiate addicts further show increased prevalence of anxiety and major depressive episodes (Grant et al., 2004). In rodents, SSRI treatment alleviates acute withdrawal symptoms following chronic exposure to morphine, a prototypical opiate (Gray, 2002). Further, SSRI prevents both heightened anxiety (Harris and Aston-Jones, 2001) and despair (Goeldner et al., 2011) during protracted withdrawal from chronic morphine.

Together therefore, data from both human and rodent studies suggest that the serotonergic regulation of emotional behaviors is altered during morphine withdrawal, and could implicate 5-HT_{1A}R dysfunction. In this study, we investigated the kinetics of 5-HT_{1A}R function following chronic morphine exposure. We treated mice using a morphine regimen known to induce dependence (Matthes et al., 1996) and focused on three time points (2 h, 1 and 4 weeks after the last morphine injection) to match our previous study on behavioral adaptations to chronic morphine (Goeldner et al., 2011). We then performed [^{35}S]GTPγS autoradiography, stimulated by the specific 5-HT_{1A}R agonist 8-OH-DPAT (Meneses and Terron, 2001), to evaluate functional coupling of the receptor to G-proteins in DRN and mPFC. Our data show regional-specific and sequential modifications of 5-HT_{1A}R function.

2. Experimental procedures

2.1. Animals

Eight-week-old male C57Bl/6J mice (Charles River Laboratories, St-Germain-sur-l'Arbresle, France) were housed 4/cage (12 h light/dark cycle, food and water ad libitum). All experiments followed ethical guidelines (European Community Guidelines 86/609/EEC) and were approved by the local ethical committee (CREMEAS, 2003-10-08-[1]-58).

2.2. General procedure

2.2.1. Experiment 1

4 naïve mice were used to determine the potency (pEC_{50}, defined as $-logEC_{50}$) and maximal effect (Emax) of (R)-(+)-8-hydroxy-2-dipropylamino-tetralin hydrobromide (8-OH-DPAT, Sigma) for stimulating [^{35}S]GTPγS binding across 4 different brain regions: DRN, mPFC, dorsal and ventral hippocampus (dHIPP, vHIPP, respectively).

2.2.2. Experiment 2

48 mice (consisting in 2 equivalent cohorts processed independently) were injected intraperitoneally with daily escalating doses of morphine sulfate (20, 40, 60, 80, 100 mg/kg; Francopia, Gentilly, France) or saline (0.9% sodium chloride) as control, twice daily for five days and received a single 100 mg/kg injection on day 6. Mice were then sacrificed (i) 2 h after the last injection (chronic treatment; saline and morphine, n=8/group), (ii) 1 week after the last injection (1-week withdrawal; saline and morphine, n=8/group), (iii) 4 weeks after the last injection (4-week withdrawal; saline, n=8; morphine, n=7).

2.3. Tissue preparation

Mice were cervically dislocated, brains rapidly removed and frozen in 2-methylpentane. Coronal sections (20 μm) were obtained at −20 °C using a cryostat microtome (Leica CM 3050) at the level of the mPFC (+2.0 to +2.4 mm from bregma), dHIPP (−2.0 to −2.4 mm), vHIPP (−3.1 to −3.5) and DRN (−4.4 to −4.8 mm) according to the mouse brain atlas (Paxinos and Franklin, 1997). Sections were thaw-mounted onto gelatin-coated slides, air-dried (room temperature, 10 min) and stored at −80 °C.

2.4. [^{35}S]GTPγS autoradiography

Sections were thawed at room temperature and rehydrated for 20 min in plastic slide mailers in assay buffer containing 50 mM Tris–HCl, 5 mM $MgCl2\text{-}6H_2O$, 100 mM NaCl, and 10 mM EDTA (pH 7.4). Sections were preincubated for 1 h with assay buffer plus 2 mM GDP (Sigma) and 1 μM 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX, Tocris bioscience). The sections were then incubated for 1.5 h with preincubation buffer plus 1 mM dithiothreitol (DTT) and 80 pM guanosine 5'-(γ-^{35}S-thio)-triphosphate ([^{35}S]GTPγS; 1,250 Ci/mmol, Perkin Elmer). Mailers were allocated to three incubation conditions: basal (no agonist present), agonist-stimulated and nonspecific (no agonist and 1 μM unlabeled GTPγS, Sigma) bindings. We used 5 (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 μM) and 2 (0.1 and 10 μM) increasing concentrations of 8-OH-DPAT in experiments 1 and 2, respectively. Sections were then rinsed and exposed to Kodak Biomax MR films for 24 hours to generate autoradiograms.

2.5. Image analysis

Autoradiograms were analyzed with an image processor (MCID Elite 7.0 software Imaging Research Inc., St Catharines, ON, Canada). Regions of interest (ROI, see Fig. 1) were drawn on images from basal binding sections and reported on images from non-specific and agonist-stimulated binding sections. Densitometric values in ROI were transformed into relative radioactive counts by calibration with simultaneously exposed [^{14}C] standards (ARC-146; American Radiochemicals) of known tissue equivalent values (nCi/g) (Miller, 1991). Non-specific binding was subtracted from both basal and agonist-stimulated binding.

2.6. Data analysis

All data are expressed as mean ± s.e.m. For experiment 1, pEC_{50} and Emax of 8-OH-DPAT-stimulated [^{35}S]GTPγS binding were calculated for each mouse by non-linear regression analysis. One-way analysis of variance was then used to compare Emax and pEC_{50} across 4 brain regions. For experiment 2, we used two-way analysis of variance with treatment and duration of withdrawal as factors, followed by Fischer's post-hoc analysis when relevant.

3. Results

In experiment 1 we quantified [^{35}S]GTPγS binding stimulated by 8-OH-DPAT in 4 brain regions of naïve mice. Fig. 1 shows dose–response activation curves for 5 agonist concentrations and images at 3 representative concentrations. pEC_{50} and Emax values for each region are shown in Table 1. Analysis of variance indicates that 8-OH-DPAT is equally potent in stimulating [^{35}S]GTPγS binding in the 4 brain areas [$F(3,12)=0.52$, $p=0.67$]. In contrast and as expected, the Emax greatly varied [$F(3,12)=34.7$, $p<0.0001$], ranging from 69.2% in the DRN to 523% in the dHIPP, reflecting variations across brain regions in both 5-HT_{1A}R density and basal G-protein coupled receptors activity. Post-hoc comparisons of Emax values between regions were all significant ($p<0.001$), except for vHIPP and mPFC ($p=0.82$). This pilot experiment indicates that 8-OH-DPAT potency is comparable across brain areas, as was previously shown in rat [^{35}S]GTPγS autoradiography experiments (Meller et al., 2000).

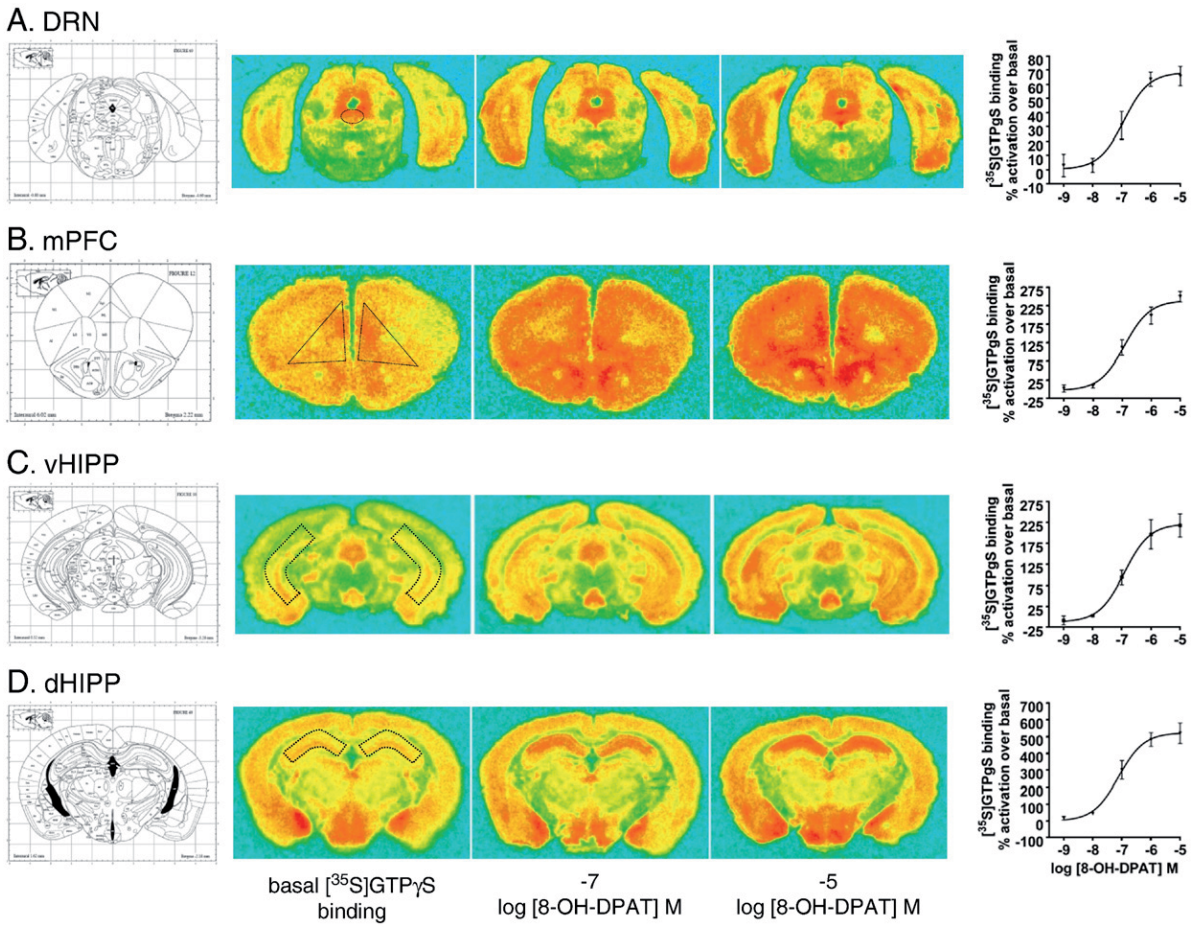


Figure 1 Representative images (artificial colors, middle) and dose-response curves (right) for 8-OH-DPAT-stimulated [^{35}S]GTPγS binding in dorsal raphe nucleus (DRN) (A), medial prefrontal cortex (mPFC) (B), dorsal (dHIPP) (C) and ventral hippocampus (vHIPP) (D) of naïve mice (n=4). Dashed lines, regions of interest for densitometry measurements according to the mouse brain atlas. Data are mean±s.e.m.

In experiment 2, we analyzed the effects of escalating doses of morphine on 5-HT$_{1A}$R function. Because of the large sample number required for quantification, we did not perform full dose-response experiments. Based on experiment 1, we selected two critical agonist concentrations that reliably reflect modifications of agonist potency and efficacy in the two brain regions, i.e. a low (0.1 μM) and a high (10 μM) concentrations corresponding to EC$_{50}$ value and maximal activation in naïve mice. In a first animal cohort, we found significant effects of morphine exposure on [^{35}S]GTPγS binding in mPFC and DRN, but not in vHIPP or dHIPP (data not shown). Thus only mPFC and DRN were analyzed in a second cohort and data pooled with those of the first cohort. Basal binding was not significantly modified by chronic injections or duration of abstinence in any of the brain regions examined (Table 2). Binding values were analyzed separately for each 8-OH-DPAT concentration and brain region and results are shown in Fig. 2.

Table 1 Maximal effect (Emax) and potency (pEC$_{50}$) of [^{35}S]GTPγS binding stimulated with 5 increasing concentrations of the 5-HT$_{1A}$ receptor agonist 8-OH-DPAT, in dorsal raphe nuclei (DRN), medial prefrontal cortex (mPFC), dorsal (dHIPP) and ventral (vHIPP) hippocampus of naïve mice (n=4). Data are mean±s.e.m.

Region	pEC$_{50}$	Emax (% over basal binding)
DRN	6.92±0.22	68.4±5.8
mPFC	6.90±0.15	238±15
dHIPP	7.11±0.17	521±32
vHIPP	6.91±0.20	221±18

In the mPFC (Fig. 2A–C) and for 10 μM of 8-OH-DPAT, two-way analysis of variance revealed a main significant effect of morphine treatment [F(1,41)=4.64, p=0.037]. In the chronic group, post-hoc analysis showed a significant increase of [^{35}S]GTPγS binding in morphine-treated mice as compared to saline controls (p=0.017, Fig. 2A). At this concentration, the duration of withdrawal had no effect [F(2,41)=1.90, p=0.16] and there was no interaction between factors [F(2,41)=1.19, p=0.31]. For 0.1 μM 8-OH-DPAT, there was no effect of treatment [F(1,41) 1.518, p=0.22] or duration of withdrawal [F(2,41)=0.077, p=0.93] and no interaction between factors [F(2,41)=1.96, p=0.15]. Hence, response to 8-OH-DPAT is increased in mPFC at the end of the chronic treatment, and this effect is no longer

Table 2 Basal binding (nCi/g) of [^{35}S]GTPγS in DRN and mPFC is not modified either by chronic injections or duration of withdrawal. Data are mean ± s.e.m. n = 7-8 mice for each treatment at each time point.

Region	Chronic		1-Week		4-Week	
	Saline	Morphine	Saline	Morphine	Saline	Morphine
DRN	2356 ± 148	2302 ± 96	2348 ± 77	2495 ± 71	2378 ± 55	2371 ± 51
mPFC	483 ± 31	413 ± 30	414 ± 40	428 ± 19	437 ± 41	334 ± 61

detected after 1- and 4-week withdrawals. Chronic morphine thus transiently sensitizes 5-HT$_{1A}$R, specifically at the level of mPFC.

In the DRN (Fig. 2D–F) and for 0.1 μM 8-OH-DPAT, there was a significant main effect of treatment [$F(1,42) = 6.22$, $p = 0.0167$]. In the 1-week withdrawal group, post-hoc comparison revealed a significant decreased agonist-stimulated binding in morphine-treated mice ($p = 0.0091$, Fig. 2E). There was no effect of withdrawal duration [$F(2,42) = 1.25$, $p = 0.30$] and no interaction between factors [$F(2,42) = 1.27$, $p = 0.30$]. At 10 μM 8-OH-DPAT, we observed no effect of treatment [$F(1,42) = 2.66$, $p = 0.11$] or time [$F(2,42) = 0.936$, $p = 0.40$] and no interaction [$F(2,42) = 0.57$, $p = 0.57$]. Therefore, 8-OH-DPAT response is decreased in the DRN after 1-week withdrawal, an effect that is not detectable either at the end of the chronic regimen or after 4 weeks. Chronic morphine leads to delayed and transient 5-HT$_{1A}$R desensitization, specifically in the DRN.

4. Discussion

Our data show that 5-HT$_{1A}$R function is enhanced in mPFC immediately after repeated morphine exposure, and decreased in DRN after 1-week withdrawal. These successive and opposing adaptations of 5-HT$_{1A}$R coupling to G-proteins, which develop either at the level of receptor density or receptor/G-protein interaction (Sovago et al., 2001), do not persist since receptor coupling is restored in both brain areas 4 weeks after treatment.

After chronic morphine, 5-HT$_{1A}$R function is enhanced in mPFC, but not in DRN. While acute morphine disinhibits serotonergic neurons and activates 5-HT$_{1A}$Rs in both DRN and projection areas (Tao and Auerbach, 1995; Fadda et al., 2005), chronic morphine was shown to decrease 5-HT neurons firing rate (Jolas et al., 2000) and sensitize 5-HT$_{1A}$R responsivity to systemic 8-OH-DPAT (Sastre-Coll et al., 2002). Negative feedback mechanisms may operate at local (DRN) or distant (mPFC) sites (Stamford et al., 2000; Celada et al., 2001). Our result suggests that chronic morphine sensitizes 5-HT$_{1A}$R-mediated control over serotonergic neurons mainly at the cortical level.

Most 5-HT$_{1A}$R studies have focused on immediate effects of pharmacological treatment or behavioral manipulation. Here we examined delayed consequences of morphine exposure, and show for the first time that reduced 5-HT$_{1A}$R function is detected only after a drug-free period. Notably, this 5-HT$_{1A}$R

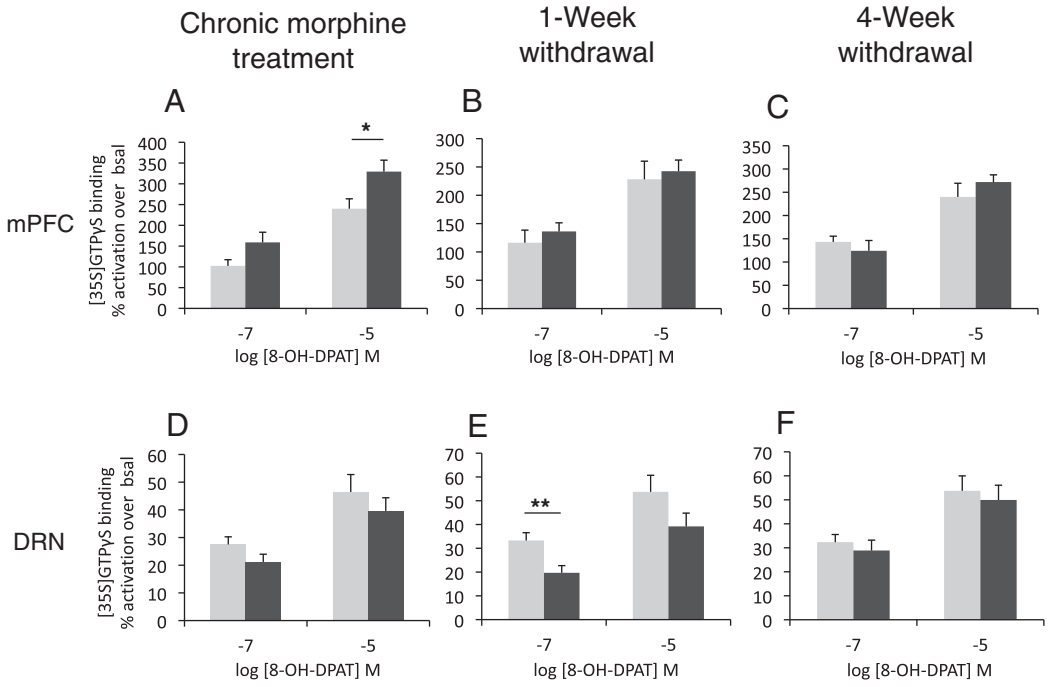


Figure 2 5-HT$_{1A}$ receptor function, measured by 8-OH-DPAT-stimulated [^{35}S]GTPγS binding, is increased after chronic morphine treatment (A and D) in mPFC, decreased after 1-week withdrawal (B and E) in DRN and unchanged after 4 weeks (C and F). Data are mean ± s.e.m. n = 7-8 mice for each treatment at each time point. *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, saline versus morphine-treated mice, two-way ANOVA with Fischer's post-hoc analysis.

desensitization is detected in DRN, as was found in previous rodent studies using chronic mild stress-induced models of depression (Lanfumey et al., 1999; Froger et al., 2004; Bambico et al., 2009), indicating that DRN-specific adaptations also occur in response to chronic opiates. The time course of DRN 5-HT$_{1A}$R desensitization is intriguing. We recently showed (Goeldner et al., 2011) that emotional-like deficits following chronic morphine are undetectable at 1-week but significant at 4-week withdrawal. Despair behavior may in fact be related to the 5-HT$_{1A}$R dysfunction observed here. Chronic morphine could disturb 5-HT$_{1A}$Rs activity transiently, and this primary event may trigger further adaptations within 5-HT circuits which may ultimately contribute to the incubation of behavioral deficits expressed at a later time point.

In conclusion our data reveal dynamic modifications of 5-HT$_{1A}$Rs, which may contribute to homeostatic dysregulation of 5-HT system in morphine abstinence and have implications towards understanding emotional distress in former opiate addicts.

Role of the funding source

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Université de Strasbourg and the National Institute of Health ((NIAAA AA-16658 and NIDA DA-16768). Funding agencies had no further role in the study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication.

Contributors

Dr A.A. Pradhan designed the protocol. Dr C. Goeldner and P.E. Lutz designed the study. P.E. Lutz performed the literature analyses, experiments, statistical analysis and wrote the first draft of the manuscript. All authors contributed to and have approved the manuscript.

Conflict of interest

All the authors declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge A. Ferrandon, Dr A. Nehlig and Pr J.M. Danion for the use of the MCID system; Dr D.Massotte for her G-protein coupled receptors expertise and Dr K. Befort for critical reading of the manuscript.

References

Bambico, F.R., Nguyen, N.T., Gobbi, G., 2009. Decline in serotonergic firing activity and desensitization of 5-HT1A autoreceptors after chronic unpredictable stress. Eur. Neuropsychopharmacol. 19, 215–228.

Celada, P., Puig, M.V., Casanovas, J.M., Guillazo, G., Artigas, F., 2001. Control of dorsal raphe serotonergic neurons by the medial prefrontal cortex: involvement of serotonin-1A, GABA(A), and glutamate receptors. J. Neurosci. 21, 9917–9929.

Fadda, P., Scherma, M., Fresu, A., Collu, M., Fratta, W., 2005. Dopamine and serotonin release in dorsal striatum and nucleus accumbens is differentially modulated by morphine in DBA/2J and C57BL/6J mice. Synapse 56, 29–38.

Froger, N., Palazzo, E., Boni, C., Hanoun, N., Saurini, F., Joubert, C., Dutriez-Casteloot, I., Enache, M., Maccari, S., Barden, N., Cohen-Salmon, C., Hamon, M., Lanfumey, L., 2004. Neurochemical and behavioral alterations in glucocorticoid receptor-impaired transgenic mice after chronic mild stress. J. Neurosci. 24, 2787–2796.

Goeldner, C., Lutz, P.E., Darcq, E., Halter, T., Clesse, D., Ouagazzal, A.M., Kieffer, B.L., 2011. Impaired emotional-like behavior and serotonergic function during protracted abstinence from chronic morphine. Biol. Psychiatry 69, 236–244.

Goodman, W.K., 2004. Selecting pharmacotherapy for generalized anxiety disorder. J. Clin. Psychiatry 65 (Suppl 13), 8–13.

Grant, B.F., Stinson, F.S., Dawson, D.A., Chou, S.P., Dufour, M.C., Compton, W., Pickering, R.P., Kaplan, K., 2004. Prevalence and co-occurrence of substance use disorders and independent mood and anxiety disorders: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. Arch. Gen. Psychiatry 61, 807–816.

Gray, A.M., 2002. The effect of fluvoxamine and sertraline on the opioid withdrawal syndrome: a combined in vivo cerebral microdialysis and behavioural study. Eur. Neuropsychopharmacol. 12, 245–254.

Harris, G.C., Aston-Jones, G., 2001. Augmented accumbal serotonin levels decrease the preference for a morphine associated environment during withdrawal. Neuropsychopharmacology 24, 75–85.

Hensler, J.G., 2003. Regulation of 5-HT1A receptor function in brain following agonist or antidepressant administration. Life Sci. 72, 1665–1682.

Jolas, T., Nestler, E.J., Aghajanian, G.K., 2000. Chronic morphine increases GABA tone on serotonergic neurons of the dorsal raphe nucleus: association with an up-regulation of the cyclic AMP pathway. Neuroscience 95, 433–443.

Koob, G.F., Volkow, N.D., 2010. Neurocircuitry of addiction. Neuropsychopharmacology 35, 217–238.

Lanfumey, L., Pardon, M.C., Laaris, N., Joubert, C., Hanoun, N., Hamon, M., Cohen-Salmon, C., 1999. 5-HT1A autoreceptor desensitization by chronic ultramild stress in mice. NeuroReport 10, 3369–3374.

Matthes, H.W., Maldonado, R., Simonin, F., Valverde, O., Slowe, S., Kitchen, I., Befort, K., Dierich, A., Le Meur, M., Dolle, P., Tzavara, E., Hanoune, J., Roques, B.P., Kieffer, B.L., 1996. Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. Nature 383, 819–823.

Meller, E., Li, H., Carr, K.D., Hiller, J.M., 2000. 5-Hydroxytryptamine(1A) receptor-stimulated [(35)S]GTPgammaS binding in rat brain: absence of regional differences in coupling efficiency. J. Pharmacol. Exp. Ther. 292, 684–691.

Meneses, A., Terron, J.A., 2001. Role of 5-HT(1A) and 5-HT(7) receptors in the facilitatory response induced by 8-OH-DPAT on learning consolidation. Behav. Brain Res. 121, 21–28.

Miller, J.A., 1991. The calibration of 35S or 32P with 14C-labeled brain paste or 14C-plastic standards for quantitative autoradiography using LKB Ultrofilm or Amersham Hyperfilm. Neurosci. Lett. 121, 211–214.

Parsey, R.V., Oquendo, M.A., Ogden, R.T., Olvet, D.M., Simpson, N., Huang, Y.Y., Van Heertum, R.L., Arango, V., Mann, J.J., 2006. Altered serotonin 1A binding in major depression: a [carbonyl-C-11] WAY100635 positron emission tomography study. Biol. Psychiatry 59, 106–113.

Paxinos, G., Franklin, K.B.J., 1997. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, 2nd ed. Academic Press, New York.

Pucadyil, T.J., Kalipatnapu, S., Chattopadhyay, A., 2005. The serotonin1A receptor: a representative member of the serotonin receptor family. Cell. Mol. Neurobiol. 25, 553–580.

Ramboz, S., Oosting, R., Amara, D.A., Kung, H.F., Blier, P., Mendelsohn, M., Mann, J.J., Brunner, D., Hen, R., 1998. Serotonin receptor 1A knockout: an animal model of anxiety-related disorder. Proc. Natl Acad. Sci. USA 95, 14476–14481.

Richardson-Jones, J.W., Craige, C.P., Guiard, B.P., Stephen, A., Metzger, K.L., Kung, H.F., Gardier, A.M., Dranovsky, A., David, D.J., Beck, S.G., Hen, R., Leonardo, E.D., 2010. 5-HT1A autoreceptor levels determine vulnerability to stress and response to antidepressants. Neuron 65, 40–52.

Sastre-Coll, A., Esteban, S., Garcia-Sevilla, J.A., 2002. Supersensitivity of 5-HT1A autoreceptors and alpha2-adrenoceptors regulating monoamine synthesis in the brain of morphine-dependent rats. Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 365, 210–219.

Savitz, J., Lucki, I., Drevets, W.C., 2009. 5-HT(1A) receptor function in major depressive disorder. Prog. Neurobiol. 88, 17–31.

Sovago, J., Dupuis, D.S., Gulyas, B., Hall, H., 2001. An overview on functional receptor autoradiography using [35S]GTPgammaS. Brain Res. Brain Res. Rev. 38, 149–164.

Stamford, J.A., Davidson, C., McLaughlin, D.P., Hopwood, S.E., 2000. Control of dorsal raphe 5-HT function by multiple 5-HT(1) autoreceptors: parallel purposes or pointless plurality? Trends Neurosci. 23, 459–465.

Tao, R., Auerbach, S.B., 1995. Involvement of the dorsal raphe but not median raphe nucleus in morphine-induced increases in serotonin release in the rat forebrain. Neuroscience 68, 553–561.

ARTICLE 4

A history of chronic morphine exposure during adolescence strain-dependently increases despair-like behaviour and promotes sociability in abstinent adult mice.

Lutz PE, Reiss D, Ouagazzal AM, Kieffer BL (submitted).

Abstract

Addiction is a chronic relapsing disorder. A crucial issue in treating addiction is to maintain a drug-free, abstinent state. Prolonged abstinence is strongly associated with mood disorders, a major contributor to relapse. In particular, substance use disorders occurring during adolescence predispose to depression later in adulthood. Using our recently established mouse model, we characterized emotional consequences of a morphine exposure episode during adolescence in adult mice. Our results indicate that morphine exposure in adolescent mice strain-dependently increases behavioural despair after prolonged abstinence. We also show that morphine treatment during adolescence strain-dependently enhances sociability in adulthood. Additional research will be required to understand where and how morphine acts during brain maturation to affect emotional and social circuits into adulthood.

1. Introduction

Addiction, defined mainly by a loss of control over drug seeking and consumption [1], is a chronic relapsing disorder. A crucial issue in treating addiction is to maintain a drug-free, abstinent state. Prolonged abstinence is characterized by a negative affective state [2] and retrospective epidemiological studies consistently show that substance use disorders, notably for opiates, strongly associate with mood disorders [3-6]. Accordingly, a history of opiate dependence confers a 50% lifetime risk of depressive comorbidity [7]. Although recognized as a major contributor to relapse, even after decades of abstinence [8-11], depression has received little attention in preclinical models of opiate dependence. Rodent studies have shown that during protracted withdrawal, i.e. abstinence from chronic opiate treatment, drug seeking is potentiated by drug-associated cues [12-14], while motivation toward natural reinforcers is disrupted [15-19]. Only a few studies explored emotional behaviours, showing that depressive-like behaviours emerge during opiate withdrawal, from 3-6 days [20, 21] up to 2-3 weeks in rat [22] and after 9 days in mouse [23]. Recently, we established a mouse model of opiate protracted withdrawal [24], in which depressive-like behaviours strengthen as abstinence unfolds. Following chronic exposure to escalating doses of morphine, a prototypical opiate, abstinent mice progressively exhibit increased despair-like behaviour and low sociability. Importantly, both deficits were reversed by chronic antidepressant treatment.

Adolescence, the transition from child- to adulthood, is a plastic and dynamic process that largely condition psychopathological risk over the lifespan [25-27], notably the emergence of mood disorders [28]. Adolescents frequently experience recreational properties of drugs of abuse [27] which eventually leads to substance use disorder in some individuals. Importantly, longitudinal studies reveal that substance use disorders occurring during adolescence predispose to depression later in adulthood [29-31]. In rodent models, a few studies have addressed effects of opiates in adolescent individuals. In self-administration paradigms, opiate reinforcement is increased for morphine in rats [32] and oxycodone in mice [33], while unchanged for heroin in rats [34]. Further, after a short (3 days) spontaneous withdrawal from chronic morphine treatment, adolescent mice showed decreased despair-like behaviour, while no such effect is found in adults [23]. These increased reinforcing and decreased withdrawal-induced aversive properties of

opiates in adolescent rodents are coherent with increased drug initiation during this period in human [35, 36]. To our knowledge, the effects of chronic opiate exposure during adolescence on emotional responses in the adult have not been addressed in mice so far.

In the present study, we used our mouse model to characterize emotional consequences of a morphine exposure episode during adolescence in adult mice. Adolescent mice received escalating morphine treatment during 6 days. After 4 weeks of abstinence, we assessed emotional-like behaviours in these mice that had become adults. We performed this analysis using three classically used inbred strains: C57BL/6JCrl (Bl6J, as in our previous work [24]), C57BL/6NCrl (Bl6N) and Balb/cByJCrl (Balb).

2. Material and methods

2.1 Animals

Postnatal day 21 (P21) male mice were obtained from Charles Rivers Laboratories (St-Germain-sur-l'Arbresle, France) and habituated to housing conditions (4 animals per cage; 12h light/dark cycle; food and water available *ad libitum*) for 1 week. All experimental procedures were performed according to standard ethical guidelines (European Community Guidelines on the Care and Use of Laboratory Animals 86/609/EEC).

2.2 Drugs

Morphine sulfate (Francopia, Gentilly, France) was prepared in saline solution (0.9% sodium chloride) and injected at a volume of 10 ml/kg.

2.3 Experimental procedure

Age of mice for morphine treatment was chosen based on previous studies (see [23] and [27] for a review) so that adolescent mice received morphine injections from P30 to P35. We used the same morphine regimen as in our previous study in adult [24]. Mice were administered intraperitoneally (i.p.) twice daily with escalating doses of morphine (20, 40, 60, 80, 100 mg/kg, n=12/mouse strain) for 5 days, followed by a single 100 mg/kg injection on day 6, or saline solution as a control (n=12/mouse strain). Then, treated mice are maintained drug free for 4 weeks (see Fig. 1A for experimental timeline). As an index of general opiate effects, mice were weighed daily during chronic injections and after 10 days (P45) and 29 days (or 4 weeks, P64) of abstinence. Beginning at P64, when abstinent mice have become adult, emotional-like and social behaviors were evaluated every other day (except for open-field and social interactions) using classical paradigms in the following order (see below) [24, 37].

2.4 Behavioural testing

2.4.1 Light-Dark (LD)

The apparatus consisted of two identical boxes (20x20x14cm) interconnected with a dark tunnel (5x7x10cm, Imetronic, Pessac, France) equipped with infrared sensors. The light compartment (white

walls) was brightly illuminated (1900 lux) from the ceiling. Mice were placed in the dark compartment (black walls) and the latency to enter the lit compartment, as well as the time spent in each compartment, were recorded during 5 min.

2.4.2 Open-field (OF)

Mice were placed during 30 min in 44x44 cm open-field arenas (Panlab, Barcelona, Spain), fitted with infrared beams allowing automated locomotor activity measures (Actitrack, Barcelona, Spain). Arenas were indirectly lit at 150 lux. Distance and time spent in the centre were recorded as locomotor activity and anxiety measures. This exposition to the open-field also served as habituation to the environment of the social interaction test, performed on the following day.

2.4.3 Social interactions (SI)

Pairs of unfamiliar mice, from different home cages but of similar treatment condition and weight, were placed simultaneously for 10 min in the open-field arena, indirectly lit at 50 lux. Our previous work indicates that both prior habituation to the arena and dim lighting favour social interactions in poorly anxiogenic conditions [24]. Using an ethological keyboard, we measured the number of occurrences and the total duration of social interaction behaviours (sniffing, following or pawing contact).

2.4.4 Tail suspension (TS)

Mice were suspended by the tail 50 cm above the floor. Activity was automatically monitored during the last 4 min of the 6-minute test (MED associates Inc, St Albans, USA), as previously described [37], with a threshold defining immobility behaviour. Latency to the first immobilization was also noted.

2.4.5 Forced swim(FS)

Mice were placed for 6 min into a glass cylinder (height, 27 cm; diameter, 18 cm) filled with 3.5 liters of water (23±1°C), and immobility time was recorded during the last 4 min [37]. Latency to the first immobilization was also noted.

2.4.6 Y-maze (YM)

Mice were individually placed in a Y-shaped apparatus consisting in three arms (placed at 120° from each other), and allowed to move freely (continuous procedure) for 5 min under moderate lighting conditions (100 lux in the centre-most region). The sequence of entries into each arm was scored for each mouse, and the Y-maze performance, i.e. the percentage of spontaneous alternation performance, was defined as the ratio of actual alternations to possible alternations (total arm entries – 2) x 100 [38, 39].

2.5 Statistical analysis

All data are expressed as mean±sem. Statistical analysis was performed using two-way analysis of variance (ANOVA) with strain and treatment as independent variables. For the weight analysis, we used a three-way mixed ANOVA, with strain and treatment as between-subject factors and time as within-subject factor. When required multiple group comparisons were performed using Fischer's post-hoc analysis. Statistical significance was defined as $p<0.05$.

3. Results

3.1. Weight growth

A growth spurt is a hallmark of adolescence in rodents, with a rapid increase in body weight during the first 5 weeks of life [27]. Accordingly, ANOVA revealed a significant main effect of time [$F(7,455)=1408$; $p<0.0001$], confirming that mice progressively gained weight during the course of the study, from P30 to P35 (Fig. 1B). ANOVA also revealed significant main effects of strain [$F(2,65)=9.99$; $p=0.0002$] and morphine treatment [$F(1,65)=49.5$; $p<0.0001$], but no interaction between these 2 factors [$F(2,65)=0.78$; $p=0.46$]. Post-hoc comparisons showed that morphine-treated mice show reduced body weight compared to saline controls (post-hoc; P31-P35, $p<0.0001$). Balb mice showed decreased body weight, compared to Bl6J or Bl6N (post-hoc; P31-35, $p<0.05$) during the course of chronic injections.

During abstinence, while left drug-free in their home-cages, morphine-abstinent mice gained more weight than saline controls (time x treatment interaction, [$F(7, 43)=19.2$; $p<0.0001$]). Thus, after 4 weeks of abstinence and prior to behavioural testing, morphine abstinent mice recovered body weight no longer different from saline controls (post-hoc; P45, $p<0.0001$; P64, $p=0.07$).

3.2 Light-dark

We first analyzed the anxiety-like behavior of morphine- or saline-abstinent mice in the light dark test (Fig. 2A & 2B). Analysis of the percentage time spent in the aversive brightly lit compartment revealed a significant main effect of strain [$F(2,65)=5.6$; $p=0.0056$], but no effect of morphine treatment [$F(1,65)=2.31$; $p=0.13$] and no interaction [$F(2,65)=0.04$; $p=0.96$]. Post-hoc analysis showed that the Bl6N showed highest levels of anxiety, an effect significant against Bl6J mice ($p=0.0014$) and very close to significance against Balb mice ($p=0.051$). We did not find any difference ($p=0.20$) between Bl6J and Balb mice in this test, coherent with previous results [40].

Accordingly, latency to first entry into the lit compartment was significantly different across strains [$F(2,65)=19$; $p<0.0001$]. Morphine treatment had no effect on this parameter [$F(1,65)=0.17$; $p=0.68$], and there was no interaction [$F(2,65)=0.90$; $p=0.41$]. Post-hoc analysis indicated that latency was increased in Bl6N mice compared to both Balb ($p<0.0001$) and Bl6J mice ($p<0.0001$).

3.3 Open-field

We also measured the percentage time spent in the centre of the OF (Fig. 2C), an index of anxiety-like behavior in rodents. We found a significant effect of strain [F(2,65)=4.42; p=0.016], with no effect of treatment [F(2,65)=2.37; p=0.13] and no interaction [F(2,65)=0.02; p=0.98]. Post-hoc analysis indicated that Balb mice showed increased anxiety-like behaviour as compared to Bl6J (p=0.007), in agreement with previous data [41, 42]. Balb mice were also more anxious than Bl6N (p=0.02), while Bl6J and Bl6N strains did not differ (p=0.70), as already reported [43].

We also assessed locomotor activity, as measured by the distance travelled in the OF (Fig. 2D). Two-way ANOVA revealed a significant effect of strain [F(2,65)=5.81; p=0.005], with no effect of morphine treatment [F(1,65)=1.46; p=0.23] and no interaction [F(2,65)=1.78; p=0.18]. Coherent with results from other groups [42, 44], Balb mice exhibited lower locomotor activity as compared to Bl6J (post-hoc, p=0.001) and Bl6N mice (post-hoc, p=0.04). The 2 later strains showed similar locomotor activity (post-hoc, p=0.20).

3.4 Social interactions

We assessed social interactions after 4 weeks of abstinence by measuring the duration (Fig. 3A) and number of occurrences (Fig. 3B) of social behaviours in the three mouse strains. ANOVA showed that strain had a significant effect on the time pairs of unfamiliar mice spent interacting [F(2,29)=7.19; p=0.003], with Balb mice showing lower levels of sociability compared to Bl6N (p=0.026) and Bl6J (p=0.0005) mice.

In addition, morphine treatment had a significant effect on the duration of social behaviours [F(1,29)=4.58; p=0.04], and there was a significant interaction between strain and treatment [F(2,29)=4.14; p=0.026]. Post-hoc comparisons showed that morphine abstinence strongly increased the duration of social behaviours in Bl6N (p=0.031) and Balb (p=0.018) mice, but had no effect in Bl6J mice (p=0.28). In Bl6N and Balb mice, increased duration of social behaviors was not due to a general hyperactivity, as locomotor activity was not modified in morphine abstinent mice (see Fig. 2D).

We also counted the number of social behaviours. ANOVA revealed that, similar to the analysis of duration, strain had a significant effect [F(2,29)=7.2; p=0.0028] on these behaviours. In addition, morphine treatment had a significant effect [F(1,29)=5.7; p=0.024], while there was no interaction [F(2,29)=1.8; p=0.18]. Post-hoc comparisons showed an increase of the number of social contacts in Bl6N (p=0.029), an effect almost significant in Balb mice (p=0.058).

3.5 Tail suspension (TS) & forced swim (FS)

We assessed the duration of immobility in the TS and FS tests, as indexes of despair-like behaviours. In both TS [F(2,65)=6.44; p=0.003] and FS [F(2,65)=4.3; p=0.018], we found a significant main effect of strain on duration of immobility (Fig. 4A & 4C). Balb mice exhibited the higher levels of immobility, being significantly different from Bl6N (p=0.011) and Bl6J (p=0.019) in the FS test (Fig. 4C), and from Bl6N (p=0.0008), but not Bl6J (p=0.17), in the TS test (Fig. 4A). Comparing Bl6J and Bl6N

strains, we found that they show similar despair-like behaviour in the FS test (p=0.84), while immobility is decreased in Bl6N in the TS test (p=0.034).

Importantly, statistical analysis revealed that morphine abstinence significantly increased the time spent immobile in the FS test [F(2,65)=4.01; p=0.049], an effect close to significance in the TS test [F(2,65)=3.56; p=0.063]. Since morphine had no effect on locomotion (see OF, in Fig. 2D), we interpret this increased immobility in abstinent animals as increased behavioural despair. Although we found no interaction between morphine and strain in both tests (TS, [F(2,65)=0.40; p=0.67] and FS, [F(2,65)=0.50; p=0.61]), results suggest that increased despair-like behaviour in morphine abstinence mainly occurs in Bl6N mice. Indeed, in the later strain, post-hoc analysis indicated that increased immobility after morphine abstinence was close to significance in both FS (p=0.062) and TS (p=0.076) tests. On the contrary, morphine had no effect in Bl6J (FS, p=0.44; TS, p=0.70) and Balb (FS, p=0.43; TS, p=0.28) mice.

3.6 Y-maze

In human, opiate dependence is associated with deficits in working memory [45, 46]. Here, morphine abstinent mice were tested using the Y-Maze (Table 1) to assess spatial working memory [47]. ANOVA revealed a significant effect of strain [F(2,64)=4.71; p=0.012], with no effect of morphine exposure [F(1,64)=0.26; p=0.61] and no interaction [F(2,64)=0.63; p=0.53]. Balb mice showed decreased spontaneous alternation (SPA) as compared to Bl6J and Bl6N mice (post-hoc, p=0.007 and p=0.013 respectively). This was already reported for Bl6J mice [39].

We also measured latency to the first immobilisation (Fig. 4B & 4D), another index of despair-like behavior [37]. We found a significant effect of strain in the TS [F(2,65)=4.7; p=0.012] and in the FS [F(2,65)=21.9; p<0.0001] tests. Coherent with the strain effect on immobility duration, Balb mice showed faster immobilization than (i) Bl6J in FS (p<0.0001) and TS (p=0.048), and (ii) Bl6N in FS (p<0.0001) and TS (p=0.003). Bl6N and Bl6J strains showed similar latencies in TS (p=0.17) and FS (p=0.99) tests.

ANOVA also revealed a significant effect of morphine treatment on latency to first immobilization in the FS [F(1,65)=6.4; p=0.013], but not in the TS [F(1,65)=0.19; p=0.67] tests. Although there was no interaction between the 2 factors (TS, [F(2,65)=1.0; p=0.37] and FS, [F(2,65)=0.7; p=0.49]), we conducted post-hoc tests as for the analysis of immobility duration. Morphine significantly decreased latency to first immobilization in Balb mice in the FS (p=0.045), but not in the TS (p=0.60). This morphine effect was close to significance in Bl6N in FS (p=0.072). Finally, morphine had no effect in Bl6J in TS (p=0.28) or FS (p=0.62), and no effect in Bl6N in TS (p=0.39).

4. Discussion

In human, adolescent substance use disorders associate with an increased risk for anxiety and depression throughout life [29-31]. In the present study we used our mouse model of opiate abstinence to assess effects of chronic morphine exposure during adolescence on emotional responses in the adult. On the other hand, opiate addiction [48, 49], as well as anxiety and depressive disorders [50] are strongly

determined by genetic factors. Inbred mouse strains allow studying these factors in preclinical models [51, 52] and high inter-strain variability has been reported for opiate physical dependence [53, 54], locomotor sensitization [55] and reinforcement [55, 56]. Few studies, however, have explored opiate-induced emotional responses across different mice strains. Here, we compared three different mouse strains. We found that abstinence from chronic morphine treatment increases the expression of despair-like behaviours and modifies sociability. Further, we observed that these effects are better detected on Bl6N and Balb genetic backgrounds.

Weight growth in adolescent mice is stopped during chronic morphine treatment

We measured body weights during escalating morphine treatment and abstinence, as an index of general opiate effects. In our previous study [24], morphine treatment decreased body weight by about 10% in adult mice, while no weight change occurred in saline-treated controls. In this study, morphine prevented adolescent growth, which otherwise occurred in saline treated animals. This effect was transient and differences were no longer significant after 4 weeks of abstinence. Morphine was shown to regulate feeding behaviours and locomotor activity in adult mice [57]. These morphine activities may also operate in adolescent animals and contribute to the observed growth arrest in our study.

Chronic morphine treatment during adolescence does not affect anxiety-like responses and working memory in adulthood

Following 4 weeks of morphine abstinence, we first assessed anxiety-like responses. Our results reveal higher levels of anxiety in Bl6N compared to Bl6J in the LD, but not in the OF. To our knowledge, only one study has compared both strains in these 2 tests. Matsuo *et al* [58]) reported (i) in the OF, increased anxiety-like behaviour in Bl6N as compared to Bl6J mice and (ii) in the LD, no difference between the 2 strains. Taken together, the results by Matsuo et al and our data suggest that Bl6N mice exhibit higher levels of anxiety-like behaviours than Bl6J across different paradigms, yet the detection of these subtle effects highly relies on experimental conditions.

Epidemiological studies in human indicate that opiate addiction strongly associates with an increased lifetime risk for anxiety disorders [7]. Our results in mice however suggest that adolescent morphine exposure does not disrupt the expression of anxiety-related responses later in adulthood, at least in two behavioural paradigms (LD and OF tests). Previous studies in our laboratory reported no effect of opiate abstinence in the same tests of anxiety, following adult exposure to either morphine [24] or heroin (Lutz et al, unpublished) using the same anxiety tests. Available data from other groups have yielded variable results, and reported either increased [59, 60] or decreased [59, 61] anxiety-like behavior. Altogether, effects of repeated mu receptor activation on anxiety-like behaviours appear complex, and highly depend on the species, opiate doses, duration of withdrawal and behavioural measures. Therefore, the comorbidity between opiate addiction and anxiety remains difficult to address in rodent models.

Chronic morphine treatment during adolescence regulates social behaviours

We found that adult Balb mice exhibit low sociability compared to Bl6N and Bl6J. Using a three-chambered apparatus, previous studies showed that Balb mice exhibit poor exploration of the compartment containing an encaged congener [62, 63]. Our results further indicate that direct physical interactions in freely moving animals are also lower in Balb mice. Intriguingly, we also observed that prior exposure to morphine in adolescent mice enhances social interactions in the adults. This result contrasts with our previous data on morphine exposure at adult stage [24]. Numerous data document the crucial regulation of social behaviours by the mu opioid receptor across various developmental stages and species. This receptor regulates early social bounds to parents or caregivers in mice [64], primates [65] and humans [66]. Later in life, social interactions with peers play an important adaptive role during adolescence [67], promoting both encounters with individuals outside the natal group and independence from this group. Interestingly, endogenous opioid peptides are released throughout the brain during social behaviours in adolescent rodents [68, 69], and the mu receptor tightly regulates social reward both in adolescent rats [70]) and mice [71]. In addition, acute social isolation enhances social investigation upon retrieval of a familiar congener in adolescent mice (P25-45), an effect that increases with the duration of the isolation period [72]. Acute morphine treatment blocks this effect of social isolation, suggesting that morphine administration can substitute for social reinforcement. Altogether these data show that the opioid system plays a key role in the critical developmental maturation of social functions. Here, we show that chronic morphine treatment in adolescent mice increases social behaviours in adulthood. Considering the phylogenetic conservation of behavioural hallmarks of adolescence, and their regulation by the opioid system, we hypothesize that repeated exposure to morphine in adolescent mice could sensitize neurological substrates responsible for the expression of social behaviours over the lifespan. Interestingly, Van den Berg et al showed that morphine treatment in adolescent rats [69], combined with social isolation, increases social interactions later in adulthood. Social behaviours occur in adolescent rodents before reproductive maturity is attained, suggesting that their neurobiological substrates, currently poorly understood, are distinct from those in adults. Activation of the mu opioid receptor within the NAc has been shown recently to promote social play [73] in adolescent rats. We may speculate that in adolescent mice, chronic morphine treatment potentiate rewarding properties of encounters with cage-mates through opioid-sensitive circuits within the NAc. This effect may be long-lasting and account for increased sociability expressed at adult age. Interestingly, in the aforementioned model of social investigation following isolation [72], a higher sensitivity to morphine was found in adolescent Balb mice as compared to Bl6J mice, a result that parallels results from the present study, showing pro-social, long-term morphine effects in Balb but not Bl6J mice. Alternatively, other neuropeptides regulating social behaviours [74] and sensitive to exogenous mu receptor activation (such as oxytocin [75] and vasopression [76]) may be implicated in long-term morphine effects on sociability.

Chronic morphine treatment during adolescence enhances despair-like behaviours in adulthood in a strain-dependant manner

We found that adult Balb mice (regardless of drug treatment) show higher levels of despair-like behaviors compared to Bl6J and Bl6N in TS and FS tests. Previous studies comparing Balb and Bl6J mice failed to detect increased levels of behavioural despair in Balb mice in the FS [77], and found no change [78] or a small increase [79] in the TS. The detection of strain differences therefore likely relies on experimental conditions in these paradigms.

Our results also indicate that adolescent morphine exposure globally increases the expression of despair-like behaviour later in adulthood, with various effects across strains. In Bl6J mice, morphine exposure during adolescence had no effect in TS, FS and social interaction tests. As already mentioned, our previous work indicated that abstinence from morphine exposure at the adult age produces a depressive-like syndrome, with increased behavioural despair and low sociability that can be prevented by chronic antidepressant treatment [24]. Together, our two studies suggest that adolescent Bl6J mice are resilient to morphine-induced emotional dysfunction, in contrast with adult mice. Interestingly, Hodgson et al recently reported that 3 days after chronic morphine exposure, adolescent but not adult C57BL/6 mice exhibit decreased immobility in the FS [23]. The authors interpreted decreased immobility in adolescent acute withdrawal as mood elation and suggested that “opioid withdrawal might affect mood differentially across ages”. Within this line, our results indicate that in Bl6J mice, beyond acute withdrawal, adolescence also associates with decreased sensitivity to long-term morphine-induced mood deregulation. Pharmakokinetic differences between adolescent and adult Bl6J mice might account for such age-related differences in morphine effects. However, this hypothesis is unlikely, as a recent report has shown that upon systemic injection (i.p.; 17,8 mg/kg [80]) morphine achieves comparable plasmatic and brain levels across from adolescence to adulthood. Alternatively, we suggest that the pharmacodynamic properties of morphine may vary during the lifespan. Adolescent and adult Bl6J mice may show differential level expression or functional activity of the mu opioid receptor, the molecular target of morphine [81], whereby chronic exogenous mu receptor activation may lead to long-term depressive-like deficits in adult mice only. The mu opioid receptor shows a region-specific dynamic pattern of expression during the post-natal development. For example in rat, expression of the mu receptor slowly declines during at least 24 months after birth in the pituitary gland [82]. In contrast, expression of this receptor rapidly increases after birth in other brain structures like the hippocampus [83] and the striatum [84], 2 structures regulating emotions. We are not aware of similar reports in mice, or during adolescence, and future studies should explore the post-natal regulation of mu receptor expression and function in the neuronal circuitry regulating emotional-like behaviours.

In contrast to Bl6J, adolescent morphine treatment induced in Balb mice the emergence of increased despair-like behaviours at adult age (FS test), while a tendancy was found in Bl6N (TS). These results suggest that genetic differences across inbred mice strains regulate adolescent mu opioid receptor signalling mediating morphine long-term effects on mood. Our findings suggest that inbred mice strains may be used to model the contribution of opiate misuse in human adolescents to the lifetime risk of

depression, and should help identify genetic risk factors (as in Bl6N and Balb) and factors of resilience [85] (as in Bl6J). In our previous studies, we presented evidence that chronic morphine treatment in adult mice impairs the serotonergic neurotransmission [24, 86]. Future studies should explore whether mu opioid receptor signalling differs in serotonergic nuclei across adolescent Bl6J, Bl6N and Balb mice.

5. Conclusion

In conclusion we show that, as for adult mice, morphine exposure in adolescent mice increases behavioural despair after prolonged abstinence, providing an animal model for comorbidity between opiate addiction and depression throughout the animal lifespan. We also show that, in contrast to adult mice, morphine treatment during adolescence enhances sociability in adulthood. Additional research will be required to understand where and how morphine acts during brain maturation to affect emotional and social circuits into adulthood.

6. References

[1] Baler RD, Volkow ND. Drug addiction: the neurobiology of disrupted self-control. Trends Mol Med. 2006;12:559-66.

[2] Koob GF, Le Moal M. Review. Neurobiological mechanisms for opponent motivational processes in addiction. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2008;363:3113-23.

[3] Grant BF, Stinson FS, Dawson DA, Chou SP, Dufour MC, Compton W, et al. Prevalence and co-occurrence of substance use disorders and independent mood and anxiety disorders: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. Arch Gen Psychiatry. 2004;61:807-16.

[4] Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Koretz D, Merikangas KR, et al. The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). JAMA. 2003;289:3095-105.

[5] Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Merikangas KR, Walters EE. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. Arch Gen Psychiatry. 2005;62:593-602.

[6] Regier DA, Farmer ME, Rae DS, Locke BZ, Keith SJ, Judd LL, et al. Comorbidity of mental disorders with alcohol and other drug abuse. Results from the Epidemiologic Catchment Area (ECA) Study. JAMA. 1990;264:2511-8.

[7] Grella CE, Karno MP, Warda US, Niv N, Moore AA. Gender and comorbidity among individuals with opioid use disorders in the NESARC study. Addict Behav. 2009;34:498-504.

[8] Brewer DD, Catalano RF, Haggerty K, Gainey RR, Fleming CB. A meta-analysis of predictors of continued drug use during and after treatment for opiate addiction. Addiction. 1998;93:73-92.

[9] Childress AR, Ehrman R, McLellan AT, MacRae J, Natale M, O'Brien CP. Can induced moods trigger drug-related responses in opiate abuse patients? J Subst Abuse Treat. 1994;11:17-23.

[10] Rounsaville BJ, Kosten TR, Weissman MM, Kleber HD. Prognostic significance of psychopathology in treated opiate addicts. A 2.5-year follow-up study. Arch Gen Psychiatry. 1986;43:739-45.

[11] Goudemand M. Les états dépressifs. Lavoisier - Médecine Sciences Publications 2010.

[12] Aston-Jones G, Harris GC. Review - Brain substrates for increased drug seeking during protracted withdrawal. Neuropharmacology. 2004;47 Suppl 1:167-79.

[13] Sakoori K, Murphy NP. Maintenance of conditioned place preferences and aversion in C57BL6 mice: effects of repeated and drug state testing. Behav Brain Res. 2005;160:34-43.

[14] Wikler A, Pescor FT. Persistence of "relapse-tendencies" of rats previously made physically dependent on morphine. Psychopharmacologia. 1970;16:375-84.

[15] Harris GC, Aston-Jones G. Altered motivation and learning following opiate withdrawal: evidence for prolonged dysregulation of reward processing. Neuropsychopharmacology. 2003;28:865-71.

[16] Lieblich I, Yirmiya R, Liebeskind JC. Intake of and preference for sweet solutions are attenuated in morphine-withdrawn rats. Behav Neurosci. 1991;105:965-70.

[17] Zhang D, Zhou X, Wang X, Xiang X, Chen H, Hao W. Morphine withdrawal decreases responding reinforced by sucrose self-administration in progressive ratio. Addict Biol. 2007;12:152-7.
[18] Cooper ZD, Shi YG, Woods JH. Reinforcer-dependent enhancement of operant responding in opioid-withdrawn rats. Psychopharmacology (Berl). 2010;212:369-78.
[19] Rouibi K, Contarino A. Increased motivation to eat in opiate-withdrawn mice. Psychopharmacology (Berl). 2011.
[20] Anraku T, Ikegaya Y, Matsuki N, Nishiyama N. Withdrawal from chronic morphine administration causes prolonged enhancement of immobility in rat forced swimming test. Psychopharmacology (Berl). 2001;157:217-20.
[21] Molina VA, Heyser CJ, Spear LP. Chronic variable stress or chronic morphine facilitates immobility in a forced swim test: reversal by naloxone. Psychopharmacology (Berl). 1994;114:433-40.
[22] Grasing K, Ghosh S. Selegiline prevents long-term changes in dopamine efflux and stress immobility during the second and third weeks of abstinence following opiate withdrawal. Neuropharmacology. 1998;37:1007-17.
[23] Hodgson SR, Hofford RS, Wellman PJ, Eitan S. Different affective response to opioid withdrawal in adolescent and adult mice. Life Sci. 2009;84:52-60.
[24] Goeldner C, Lutz PE, Darcq E, Halter T, Clesse D, Ouagazzal AM, et al. Impaired emotional-like behavior and serotonergic function during protracted abstinence from chronic morphine. Biol Psychiatry. 2011;69:236-44.
[25] Paus T, Keshavan M, Giedd JN. Why do many psychiatric disorders emerge during adolescence? Nat Rev Neurosci. 2008;9:947-57.
[26] Romeo RD. Adolescence: a central event in shaping stress reactivity. Dev Psychobiol. 2010;52:244-53.
[27] Spear LP. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. Neurosci Biobehav Rev. 2000;24:417-63.
[28] Romeo RD. Pubertal maturation and programming of hypothalamic-pituitary-adrenal reactivity. Front Neuroendocrinol. 2010;31:232-40.
[29] Degenhardt L, Coffey C, Moran P, Carlin JB, Patton GC. The predictors and consequences of adolescent amphetamine use: findings from the Victoria Adolescent Health Cohort Study. Addiction. 2007;102:1076-84.
[30] Hayatbakhsh MR, Najman JM, Jamrozik K, Mamun AA, Alati R, Bor W. Cannabis and anxiety and depression in young adults: a large prospective study. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry. 2007;46:408-17.
[31] Rao U, Daley SE, Hammen C. Relationship between depression and substance use disorders in adolescent women during the transition to adulthood. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry. 2000;39:215-22.

[32] Doherty J, Ogbomnwan Y, Williams B, Frantz K. Age-dependent morphine intake and cue-induced reinstatement, but not escalation in intake, by adolescent and adult male rats. Pharmacol Biochem Behav. 2009;92:164-72.
[33] Zhang Y, Picetti R, Butelman ER, Schlussman SD, Ho A, Kreek MJ. Behavioral and neurochemical changes induced by oxycodone differ between adolescent and adult mice. Neuropsychopharmacology. 2009;34:912-22.
[34] Doherty JM, Frantz KJ. Heroin self-administration and reinstatement of heroin-seeking in adolescent vs. adult male rats. Psychopharmacology (Berl). 2011.
[35] Somerville LH, Jones RM, Casey BJ. A time of change: behavioral and neural correlates of adolescent sensitivity to appetitive and aversive environmental cues. Brain Cogn. 2009;72:124-33.
[36] Yurgelun-Todd D. Emotional and cognitive changes during adolescence. Curr Opin Neurobiol. 2007;17:251-7.
[37] Goeldner C, Reiss D, Kieffer BL, Ouagazzal AM. Endogenous nociceptin/orphanin-FQ in the dorsal hippocampus facilitates despair-related behavior. Hippocampus. 2010;20:911-6.
[38] Wall PM, Blanchard RJ, Yang M, Blanchard DC. Infralimbic D2 receptor influences on anxiety-like behavior and active memory/attention in CD-1 mice. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2003;27:395-410.
[39] Mandillo S, Tucci V, Holter SM, Meziane H, Banchaabouchi MA, Kallnik M, et al. Reliability, robustness, and reproducibility in mouse behavioral phenotyping: a cross-laboratory study. Physiol Genomics. 2008;34:243-55.
[40] Belzung C, Le Guisquet AM, Crestani F. Flumazenil induces benzodiazepine partial agonist-like effects in BALB/c but not C57BL/6 mice. Psychopharmacology (Berl). 2000;148:24-32.
[41] Akillioglu K, Melik EB, Melik E, Boga A. Effect of ketamine on exploratory behaviour in BALB/C and C57BL/6 mice. Pharmacol Biochem Behav. 2012;100:513-7.
[42] Tang X, Orchard SM, Sanford LD. Home cage activity and behavioral performance in inbred and hybrid mice. Behav Brain Res. 2002;136:555-69.
[43] Bothe GW, Bolivar VJ, Vedder MJ, Geistfeld JG. Genetic and behavioral differences among five inbred mouse strains commonly used in the production of transgenic and knockout mice. Genes Brain Behav. 2004;3:149-57.
[44] Carola V, D'Olimpio F, Brunamonti E, Mangia F, Renzi P. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. Behav Brain Res. 2002;134:49-57.
[45] Lundqvist T. Cognitive consequences of cannabis use: comparison with abuse of stimulants and heroin with regard to attention, memory and executive functions. Pharmacol Biochem Behav. 2005;81:319-30.
[46] Fishbein DH, Krupitsky E, Flannery BA, Langevin DJ, Bobashev G, Verbitskaya E, et al. Neurocognitive characterizations of Russian heroin addicts without a significant history of other drug use. Drug Alcohol Depend. 2007;90:25-38.

[47] Hughes RN. The value of spontaneous alternation behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory. Neurosci Biobehav Rev. 2004;28:497-505.
[48] Kendler KS, Prescott CA, Myers J, Neale MC. The structure of genetic and environmental risk factors for common psychiatric and substance use disorders in men and women. Arch Gen Psychiatry. 2003;60:929-37.
[49] Goldman D, Oroszi G, Ducci F. The genetics of addictions: uncovering the genes. Nat Rev Genet. 2005;6:521-32.
[50] Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, Taylor A, Craig IW, Harrington H, et al. Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. Science. 2003;301:386-9.
[51] Pothion S, Bizot JC, Trovero F, Belzung C. Strain differences in sucrose preference and in the consequences of unpredictable chronic mild stress. Behav Brain Res. 2004;155:135-46.
[52] Zhang X, Beaulieu JM, Sotnikova TD, Gainetdinov RR, Caron MG. Tryptophan hydroxylase-2 controls brain serotonin synthesis. Science. 2004;305:217.
[53] Kest B, Palmese CA, Hopkins E, Adler M, Juni A, Mogil JS. Naloxone-precipitated withdrawal jumping in 11 inbred mouse strains: evidence for common genetic mechanisms in acute and chronic morphine physical dependence. Neuroscience. 2002;115:463-9.
[54] Klein G, Juni A, Waxman AR, Arout CA, Inturrisi CE, Kest B. A survey of acute and chronic heroin dependence in ten inbred mouse strains: evidence of genetic correlation with morphine dependence. Pharmacol Biochem Behav. 2008;90:447-52.
[55] Szumlinski KK, Lominac KD, Frys KA, Middaugh LD. Genetic variation in heroin-induced changes in behaviour: effects of B6 strain dose on conditioned reward and locomotor sensitization in 129-B6 hybrid mice. Genes Brain Behav. 2005;4:324-36.
[56] Belzung C, Barreau S. Differences in drug-induced place conditioning between BALB/c and C57Bl/6 mice. Pharmacol Biochem Behav. 2000;65:419-23.
[57] Bodnar RJ. Endogenous opiates and behavior: 2010. Peptides. 2011;32:2522-52.
[58] Matsuo N, Takao K, Nakanishi K, Yamasaki N, Tanda K, Miyakawa T. Behavioral profiles of three C57BL/6 substrains. Front Behav Neurosci. 2010;4:29.
[59] Buckman SG, Hodgson SR, Hofford RS, Eitan S. Increased elevated plus maze open-arm time in mice during spontaneous morphine withdrawal. Behav Brain Res. 2009;197:454-6.
[60] Harris GC, Aston-Jones G. Augmented accumbal serotonin levels decrease the preference for a morphine associated environment during withdrawal. Neuropsychopharmacology. 2001;24:75-85.
[61] Grasing K, Wang A, Schlussman S. Behavioral measures of anxiety during opiate withdrawal. Behav Brain Res. 1996;80:195-201.
[62] Sankoorikal GM, Kaercher KA, Boon CJ, Lee JK, Brodkin ES. A mouse model system for genetic analysis of sociability: C57BL/6J versus BALB/cJ inbred mouse strains. Biol Psychiatry. 2006;59:415-23.
[63] Moy SS, Nadler JJ, Young NB, Perez A, Holloway LP, Barbaro RP, et al. Mouse behavioral tasks relevant to autism: phenotypes of 10 inbred strains. Behav Brain Res. 2007;176:4-20.

[64] Moles A, Kieffer BL, D'Amato FR. Deficit in attachment behavior in mice lacking the mu-opioid receptor gene. Science. 2004;304:1983-6.
[65] Barr CS, Schwandt ML, Lindell SG, Higley JD, Maestripieri D, Goldman D, et al. Variation at the mu-opioid receptor gene (OPRM1) influences attachment behavior in infant primates. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105:5277-81.
[66] Copeland WE, Sun H, Costello EJ, Angold A, Heilig MA, Barr CS. Child mu-opioid receptor gene variant influences parent-child relations. Neuropsychopharmacology. 2011;36:1165-70.
[67] Ladd GW. Peer relationships and social competence during early and middle childhood. Annu Rev Psychol. 1999;50:333-59.
[68] Depue RA, Morrone-Strupinsky JV. A neurobehavioral model of affiliative bonding: implications for conceptualizing a human trait of affiliation. Behav Brain Sci. 2005;28:313-50; discussion 50-95.
[69] Van den Berg CL, Kitchen I, Gerrits MA, Spruijt BM, Van Ree JM. Morphine treatment during juvenile isolation increases social activity and opioid peptides release in the adult rat. Brain Res. 1999;830:16-23.
[70] Trezza V, Baarendse PJ, Vanderschuren LJ. The pleasures of play: pharmacological insights into social reward mechanisms. Trends Pharmacol Sci. 2010;31:463-9.
[71] Panksepp JB, Lahvis GP. Social reward among juvenile mice. Genes Brain Behav. 2007;6:661-71.
[72] Panksepp JB, Wong JC, Kennedy BC, Lahvis GP. Differential entrainment of a social rhythm in adolescent mice. Behav Brain Res. 2008;195:239-45.
[73] Trezza V, Damsteegt R, Achterberg EJ, Vanderschuren LJ. Nucleus Accumbens {micro}-Opioid Receptors Mediate Social Reward. J Neurosci. 2011;31:6362-70.
[74] Meyer-Lindenberg A, Domes G, Kirsch P, Heinrichs M. Oxytocin and vasopressin in the human brain: social neuropeptides for translational medicine. Nat Rev Neurosci. 2011;12:524-38.
[75] Morris MS, Domino EF, Domino SE. Opioid modulation of oxytocin release. J Clin Pharmacol. 2010;50:1112-7.
[76] Honda K, Takano Y. New topics in vasopressin receptors and approach to novel drugs: involvement of vasopressin V1a and V1b receptors in nociceptive responses and morphine-induced effects. J Pharmacol Sci. 2009;109:38-43.
[77] Dulawa SC, Holick KA, Gundersen B, Hen R. Effects of chronic fluoxetine in animal models of anxiety and depression. Neuropsychopharmacology. 2004;29:1321-30.
[78] Liu X, Gershenfeld HK. Genetic differences in the tail-suspension test and its relationship to imipramine response among 11 inbred strains of mice. Biol Psychiatry. 2001;49:575-81.
[79] Norcross M, Mathur P, Enoch AJ, Karlsson RM, Brigman JL, Cameron HA, et al. Effects of adolescent fluoxetine treatment on fear-, anxiety- or stress-related behaviors in C57BL/6J or BALB/cJ mice. Psychopharmacology (Berl). 2008;200:413-24.
[80] Koek W, France CP, Javors MA. Morphine-induced motor stimulation, motor incoordination, and hypothermia in adolescent and adult mice. Psychopharmacology (Berl). 2012;219:1027-37.

[81] Matthes HW, Maldonado R, Simonin F, Valverde O, Slowe S, Kitchen I, et al. Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. Nature. 1996;383:819-23.
[82] Carretero J, Bodego P, Rodriguez RE, Rubio M, Blanco E, Burks DJ. Expression of the mu-opioid receptor in the anterior pituitary gland is influenced by age and sex. Neuropeptides. 2004;38:63-8.
[83] Gazyakan E, Disko U, Haaf A, Heimrich B, Jackisch R. Postnatal development of opioid receptors modulating acetylcholine release in hippocampus and septum of the rat. Brain Res Dev Brain Res. 2000;123:135-41.
[84] Talbot JN, Happe HK, Murrin LC. Mu opioid receptor coupling to Gi/o proteins increases during postnatal development in rat brain. J Pharmacol Exp Ther. 2005;314:596-602.
[85] Feder A, Nestler EJ, Charney DS. Psychobiology and molecular genetics of resilience. Nat Rev Neurosci. 2009;10:446-57.
[86] Lutz PE, Pradhan AA, Goeldner C, Kieffer BL. Sequential and opposing alterations of 5-HT(1A) receptor function during withdrawal from chronic morphine. Eur Neuropsychopharmacol. 2011;in press.

7. Legends to figures and table

Figure 1. Experimental timeline (A) and weight evolution (B) during chronic morphine treatment and 4-week abstinence. C57BL/J6 (Bl6J), C57BL/6N (Bl6N) and Balb/cByJ (Balb) mice received chronic injections with increasing morphine doses (20-100 mg/kg, i.p., twice daily), or saline (n=12 mice/group/strain), during 6 days, from post-natal day 30 (P30) to P35. After 4 weeks of abstinence, behavioural responses were assessed in the following order: light-dark (LD), open-field (OF), social interactions (SI), tail suspension (TS), forced swim (FS) and Y-maze (YM) tests. As an index of general opiate effects, mice were weighed daily during chronic injections and after 10 (P45) and 29 (P64) days of abstinence. Morphine-treated mice showed significantly decreased body weights compared to saline controls from P31 to P45. Balb mice showed lowest weight during the course of chronic injections (see text). Data are mean ± s.e.m. ***, $p<0.001$, ANOVA main effect of morphine treatment.

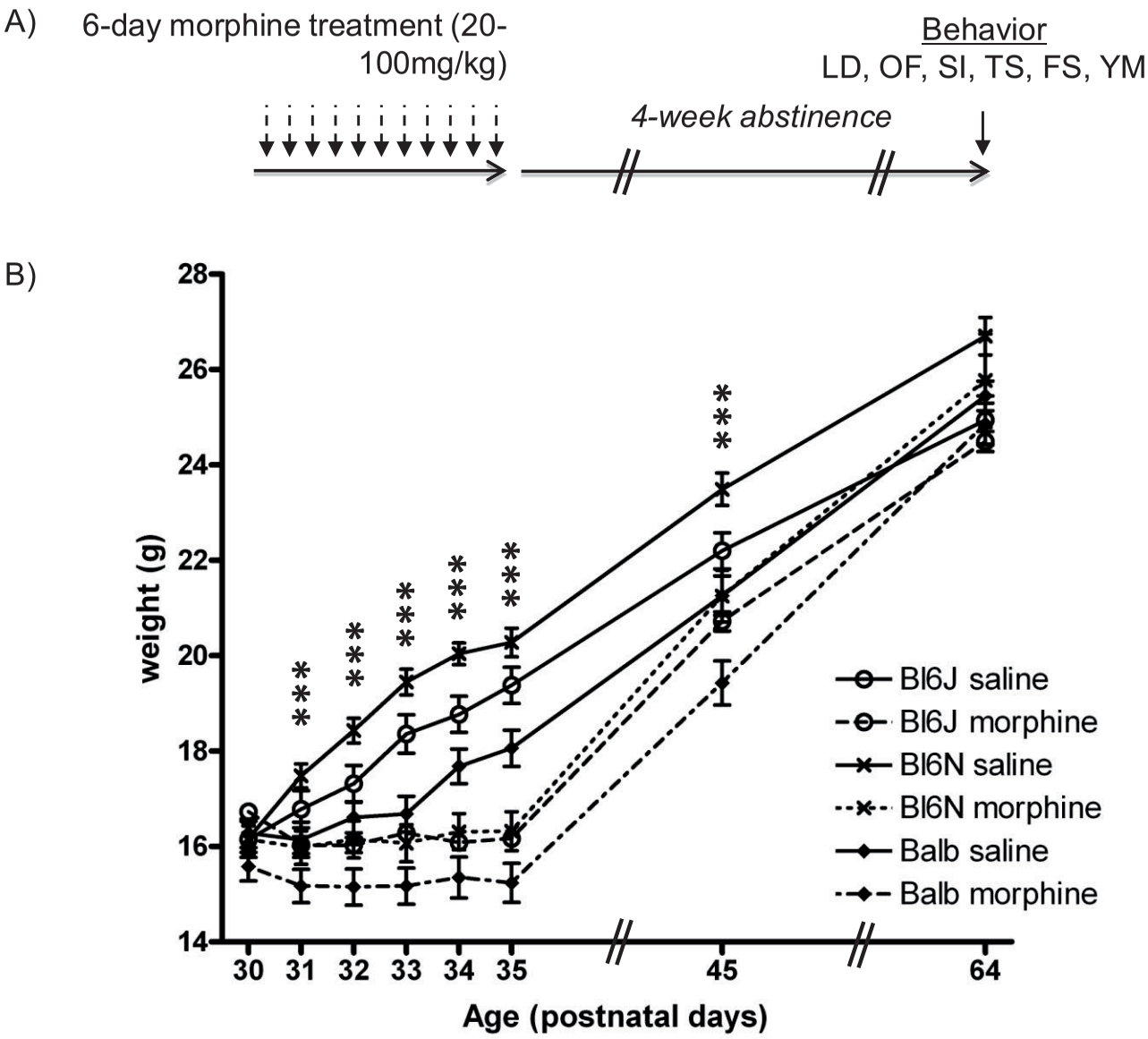
Figure 2. Chronic morphine treatment during adolescence does not affect anxiety-like responses and locomotor activity in adulthood. 4 weeks after the last morphine or saline injection (n=12 mice/group/strain), we assessed behavioural responses in C57BL/J6 (Bl6J), C57BL/6N (Bl6N) and Balb/cByJ (Balb) mice. Morphine abstinence had no effect on anxiety-like behaviours in the Light-Dark (**A**, **B**) and the Open-Field (**C**), or on locomotor activity in the OF (**D**). Bl6N and Balb mice showed significantly higher levels of anxiety in LD and OF tests, respectively, compared to the two other strains (see text). Data are mean ± s.e.m.

Figure 3. Chronic morphine treatment during adolescence increases social behaviours in adulthood. 4 weeks after the last morphine or saline injection (n=12 mice/group/strain), we assessed social behaviours in C57BL/6J (Bl6J), C57BL/6N (Bl6N) and Balb/cByJ (Balb) mice. Morphine abstinence increased the number of occurrences **(A)** and the total duration **(B)** of social interaction behaviours in Bl6N and Balb mice, but not in Bl6J. Balb mice showed less social interactions compared to the two other strains (see text). Data are mean ± s.e.m. *, $p<0.05$, ANOVA main effect of morphine abstinence; §, $p<0.05$, post-hoc comparisons for the effect of morphine abstinence in each strain.

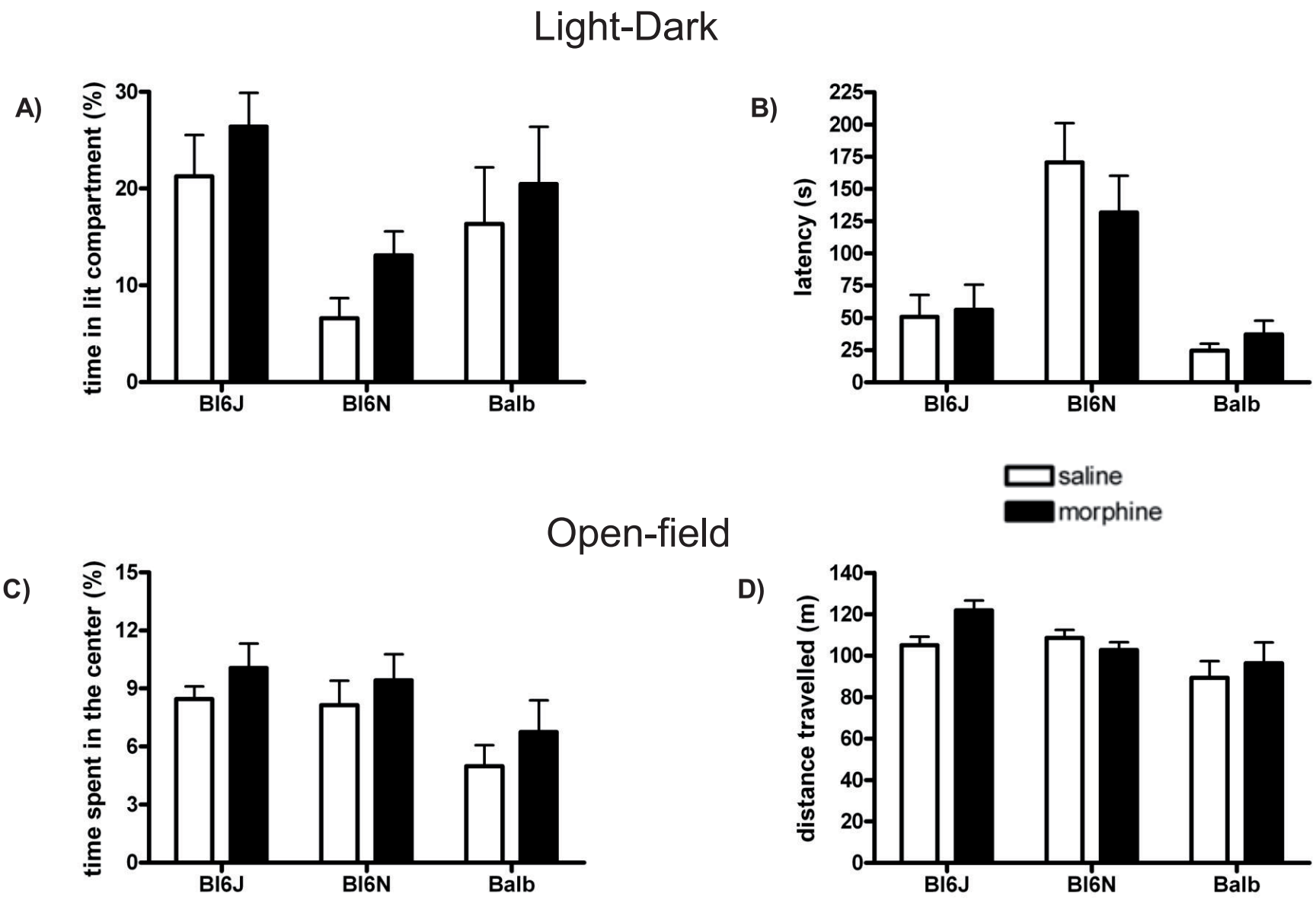
Figure 4. Chronic morphine treatment during adolescence increases despair-like behaviours in adulthood. 4 weeks after the last morphine or saline injection (n=12 mice/group/strain), we assessed behavioural responses in tail suspension and forced swim tests of C57BL/6J (Bl6J), C57BL/6N (Bl6N) and Balb/cByJ (Balb) mice. Time spent immobile (A & C) and latency to first immobilization (B & D) are represented. Morphine abstinence increased despair-like behaviours in the forced swim (immobility and latency to first immobilization, **C and D**), and this effect was almost significant in the tail suspension (immobility duration, **A**). Balb mice showed significantly higher despair-like behaviours compared to the two other strains (see text).Data are mean ± s.e.m. *, $p<0.05$, ANOVA main effect of morphine abstinence; §, $p<0.05$, post-hoc comparisons for the effect of morphine abstinence in each strain.

Table 1. Chronic morphine treatment during adolescence does not affect spatial working memory in adulthood. 4 weeks after the last morphine (n=12 mice/strain) or saline injection (n=12 mice/strain), we assessed spatial working memory in C57BL/6J, C57BL/6N (Bl6N) and Balb/cByJ (Balb) mice. SPA=spontaneous alternation. Data are mean ± s.e.m.

	BL/6J		**BL/6N**		**Balb**	
Test	**Saline**	**Morphine**	**Saline**	**Morphine**	**Saline**	**Morphine**
%SPA	64,7±3,5%	58,8±2,9%	61,7±3,3%	60,1±3,5%	49,9±4,6%	52,6±4,7%

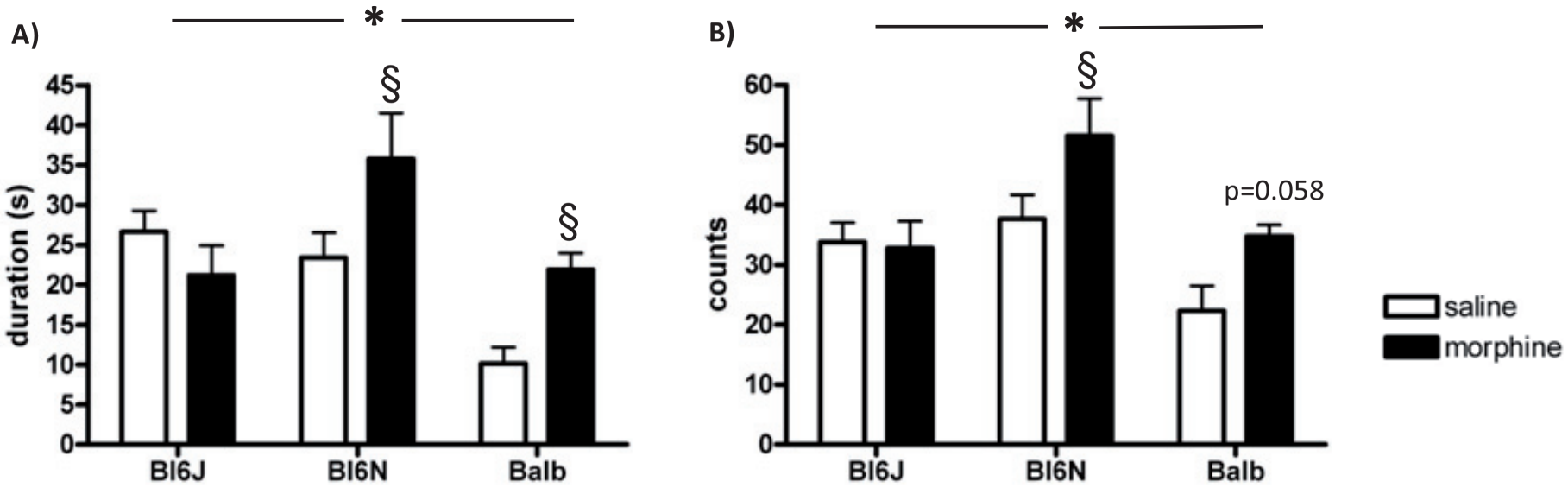


Article 4. Lutz et al. Figure 1.

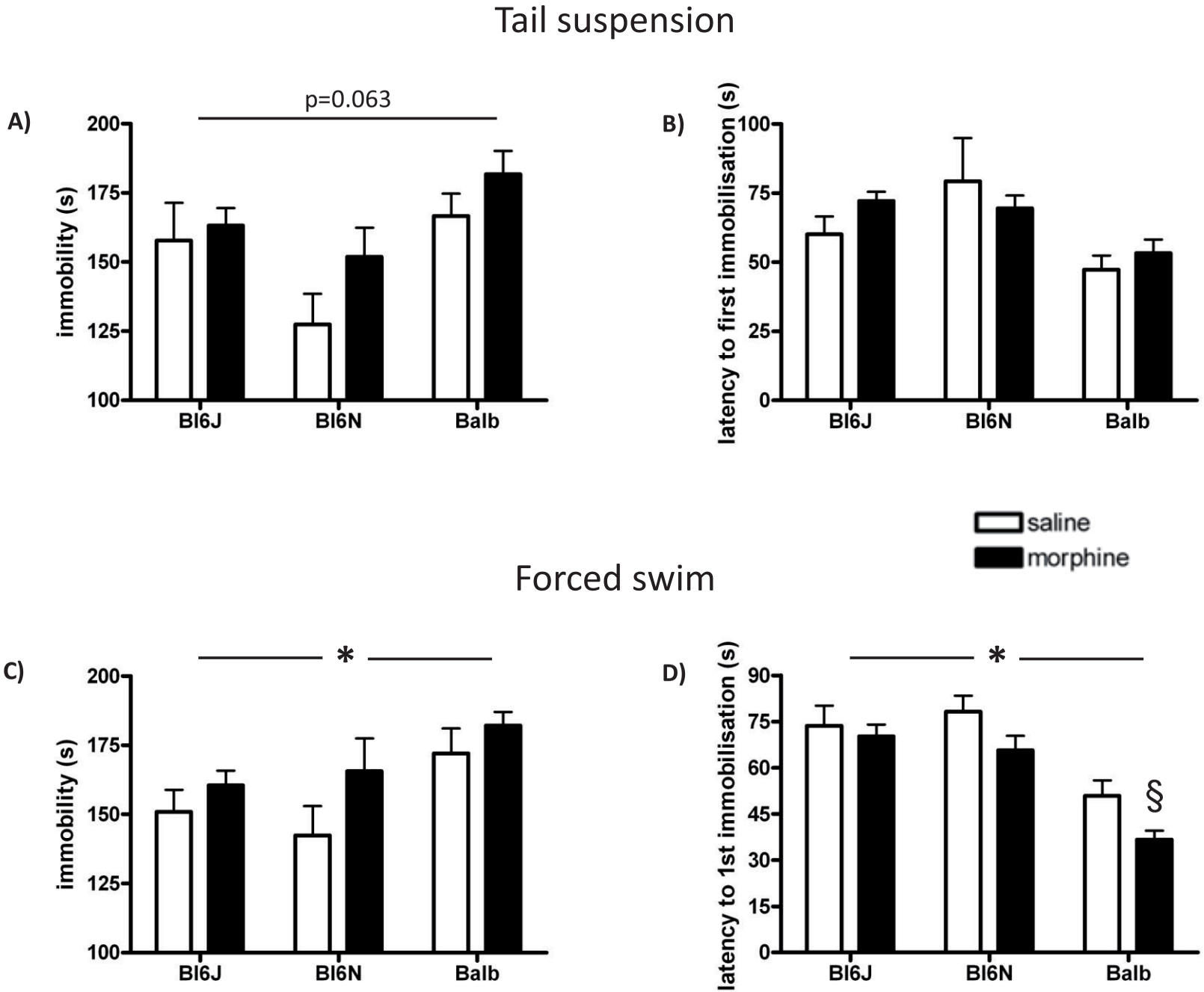


Article 4. Lutz et al. Figure 2.

Social interactions



Article 4. Lutz et al. Figure 3.



Article 4. Lutz et al. Figure 4.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

CHAPITRE VI. MODELISATION DE L'ABSTINENCE A L'HEROÏNE CHEZ LA SOURIS

Nous avons montré dans le chapitre précédent que l'abstinence à la morphine produit dans notre modèle murin des déficits comportementaux de type dépressif. Afin d'approfondir ce modèle et d'élargir sa portée, nous avons dans une deuxième étape décidé d'étudier les comportements émotionnels lors de l'abstinence à l'héroïne. L'héroïne est un opiacé illicite de synthèse, dont les propriétés euphorisantes puissantes en font un produit au potentiel toxicomanogène plus important que la morphine. Nous présentons ici un ensemble de résultats non publiés.

Dans une première étape (**expérience 1**), nous avons étudié la cinétique des régulations émotionnelles au cours de l'abstinence à l'héroïne. Nous avons étudié, comme dans notre travail sur la morphine, les comportements des animaux abstinents depuis 1 et 4 semaines. Nous nous sommes également intéressés à une durée d'abstinence de 7 semaines, afin d'évaluer la persistance à plus long terme des anomalies observées. Dans une deuxième étape (**expérience 2**), nous avons étudié l'effet d'un traitement chronique à la FLX sur ces déficits comportementaux. Ces deux séries d'expériences indiquent que comme pour la morphine, l'abstinence à l'héroïne induit un retrait social prononcé, dont l'émergence peut être prévenue par un traitement antidépresseur chronique.

Dans une troisième étape, nous avons utilisé les outils génétiques disponibles au laboratoire pour aborder le rôle de chacun des 3 récepteurs opioïdes dans notre modèle. Nous avons tout d'abord étudié le rôle des récepteurs opioïdes delta et kappa dans l'abstinence à l'héroïne, en utilisant les souris KO correspondantes (**expériences 3 et 4**). Les résultats indiquent que le phénotype abstinent est aggravé et atténué, respectivement, chez les souris KO delta et kappa. Enfin, nous abordons actuellement dans notre modèle le rôle du récepteur opioïde mu, la cible moléculaire commune à la morphine et à l'héroïne (**expérience 5**). Nous faisons l'hypothèse de l'implication causale du récepteur mu et du système sérotoninergique dans les déficits comportementaux apparaissant suite au traitement opiacé escaladant. Nous utilisons une stratégie de KO conditionnel du récepteur mu spécifiquement dans le DRN, et présentons ici les résultats préliminaires démontrant la faisabilité technologique de cette approche.

Enfin, nous avons débuté une vaste étude de caractérisation des adaptations moléculaires se produisant dans le DRN en fonction de l'abstinence à l'héroïne et du traitement antidépresseur chronique (**expérience 6**). Nous étudions à l'échelle du génome entier les modifications des niveaux d'ARN messagers (ARNm) et de miR selon ces 2 conditions expérimentales. Il s'agit de la première caractérisation du « miRNome » du DRN chez la souris, à notre connaissance. Nous présentons ici des résultats très préliminaires de l'analyse de la grande quantité de données générées.

Expérience 1. L'abstinence à l'héroïne chez la souris : cinétique comportementale

Afin de renforcer et de généraliser notre modèle, nous avons décidé de caractériser l'abstinence à l'héroïne chez la souris adulte. Nous avons vu que la dépendance physique aux opiacés peut être établie chez la souris par des injections quotidiennes et répétées de morphine, en utilisant des doses croissantes de 20 à 100 mg/kg, par analogie avec les prises d'opiacés en bolus chez l'humain. L'utilisation de doses croissantes a été historiquement privilégiée dans notre laboratoire pour induire une dépendance physique forte et quantifiable aisément par l'administration de naloxone, antagoniste opioïde général qui permet de précipiter un sevrage aigu (Matthes et al., 1996). L'analyse de la littérature indique que des traitements opiacés escaladant utilisant des doses croissantes de morphine proches de celles de notre protocole (de 10 à 40 mg/kg) ou des doses d'héroïne divisée par deux (de 5 à 20 mg/kg), induisent des niveaux de dépendance physique très similaire chez les souris de souche C57BL/6J (Kest et al., 2002; Klein et al., 2008). Ainsi, nous avons décidé d'utiliser dans notre étude sur l'héroïne des doses croissantes, divisées par deux par rapport à notre étude sur la morphine. La dose d'héroïne administrée est ainsi de 10 mg/kg le premier jour, puis augmente quotidiennement de 10 mg/kg pour atteindre 50 mg/kg le jour 5. Comme pour notre travail avec la morphine, l'héroïne est injectée aux souris 2 fois par jour (9 h-19 h) par voie intra-péritonéale (i.p.). Le jour 6, une troisième et dernière dose de 50 mg/kg est administrée le matin. Nous avons mesuré les réponses émotionnelles de souris abstinentes depuis 1 et 4 semaines, comme lors de notre travail sur la morphine et d'autres études dans notre laboratoire sur les adaptations transcriptionnelles au cours de l'abstinence à différentes drogues d'abus (Befort et al., 2008a; Befort et al., 2008b; Le Merrer et al., 2011). En outre, afin d'évaluer l'évolution des déficits observés sur une période plus longue, nous avons également étudié les effets d'une période d'abstinence de 7 semaines, respectant ainsi deux périodes de 3 semaines entre les 3 points expérimentaux étudiés.

a) Matériels et méthodes

Schéma expérimental

Nous avons étudié les effets comportementaux à long terme de l'abstinence à ce traitement héroïne chez des souris de souche C57BL/6JCrl. Les souris du groupe contrôle sont injectées selon le même mode avec la solution saline. Suite à la dernière injection, les souris traitées avec le véhicule (saline, n=14) ou l'héroïne (n=14) retournent à leur hébergement habituel pour une durée de 1 (n=24 saline, n=24 héroïne), 4 (n=24 saline, n=24 héroïne) ou 7 semaines (n=24 saline, n=24 héroïne) d'abstinence, et subissent un sevrage spontané (le poids et l'état général sont suivis, mais le sevrage spontané n'est pas mesuré). Les tests comportementaux sont réalisés à l'issue de ces différents temps de sevrage. Chaque durée d'abstinence a été étudiée sur 2 cohortes d'animaux indépendantes. Les animaux sont pesés chaque jour pendant le traitement héroïne escaladant, puis le $6^{ème}$ jour de la période d'abstinence et la veille du début des tests comportementaux.

Animaux et conditions d'hébergement

Les souris mâles adultes de souche C57BL/6J (Charles River, France) sont livrées âgées de 8 semaines, puis sont hébergées 2 semaines avant le début de l'expérimentation selon les conditions standard de la plateforme de phénotypage de l'Institut Clinique de la Souris (Illkirch, France). Au nombre de 4 par cage (cages M.I.C.E., Charles River), elles disposent d'eau et de nourriture (SAFE R04) *ad libitum*. La température est maintenue à 23±1°C et le cycle d'éclairage 12h/12h constant. Trente minutes avant chaque test de comportement, les animaux sont déplacés dans une antichambre qui communique avec la salle d'expérience afin de permettre une habituation aux conditions expérimentales et de diminuer l'impact du stress sur les évaluations comportementales. Les protocoles expérimentaux suivent les recommandations éthiques standards (European Community Guidelines on the Care and Use of Laboratory Animals 86/609/EEC) et ont été approuvés par le comité d'éthique régional (CREMEAS, 2003-10-08-[1]-58), ainsi que par le comité d'éthique de notre institut (IGBMC Com'Eth, saisine N°2010-013).

Drogues

Le sulfate de diacétylmorphine (Francopia, France) est dissous dans une solution isotonique de NaCl 9‰ et injecté à un volume de 10 ml/kg, par voie intra-péritonéale (i.p.).

Tests comportementaux

Les tests comportementaux sont effectués dans l'ordre suivant : champ ouvert, interaction sociale, suspension caudale, nage forcée et labyrinthe en Y, avec 2 jours de délai entre chacun des tests à l'exception des tests du champ ouvert et d'interaction sociale, qui sont consécutifs (24 heures d'intervalle). Pour les groupes d'animaux abstinents pendant 1 semaine, afin d'éviter une trop grande dispersion des tests comportementaux autour de cette durée d'abstinence, nous n'avons pas réalisé le test de suspension caudale et les tests sont réalisés avec seulement 24 heures d'intervalle, entre les jours 6 et 11 d'abstinence.

Champ ouvert

Le champ ouvert est une arène carrée (45x45 cm) haute de 17 cm délimitée par des parois transparentes et un sol en PVC noir (Panlab, Espagne). L'arène est éclairée de manière indirecte, à 150 lux. Deux cadres équipés de faisceaux infrarouges permettent de mesurer l'activité locomotrice et l'activité en redressement. Grâce au logiciel Actitrack (Panlab, Espagne), deux zones sont définies, une zone periphérique large de 8 cm et une zone centrale. Les souris sont déposées dans la zone périphérique et leur activité, leur trajectoire ainsi que le temps passé dans chaque zone sont enregistrés pendant 30 minutes.

Interaction sociale

Le test de l'interaction sociale permet d'évaluer la réponse comportementale face à un congénère mâle potentiellement dangereux (File and Seth, 2003). Il évalue les comportements apparentés à l'anxiété lorsque les conditions expérimentales sont aversives (éclairage, environnement nouveau) ou les comportements sociaux proprement dits en conditions peu aversives (éclairage faible, environnement connu) comme dans nos conditions.

Pour les expériences 1 et 2, deux animaux de poids similaire et de même condition expérimentale (injections de solution saline ou d'héroïne suivies de l'abstinence), provenant de cages d'hébergement différentes (c'est-à-dire non familières), sont placés simultanément dans une arène familière (arène du champ ouvert à laquelle ils ont été exposés de manière équivalente 24 heures auparavant, pendant le test du champ ouvert) éclairée à 50 lux (procédure selon (File and Hyde, 1978). Le nombre et la durée de leurs interactions sont observés pendant 10 minutes à l'aide d'une caméra placée au-dessus de l'arène et mesurés à l'aide d'un clavier éthologique (Viewpoint, France). Les comportements comptabilisés sont les comportements sociaux qui incluent le reniflement du partenaire (naso-buccal, naso-anal), les comportements de poursuite et les contacts physiques dont le toilettage social. Les comportements individuels sont représentés par le toilettage individuel.

Suspension caudale

Les souris sont suspendues par la queue à un crochet relié à un dynamomètre, dans un dispositif automatisé (MED associate), pendant 6 minutes. Un seuil d'activité de débattement est défini, en dessous duquel l'activité sera comptabilisée comme comportement d'immobilité. La latence avant la première immobilisation, et la durée d'immobilité au cours des 4 dernières minutes du test sont mesurées.

Nage forcée

Un bécher de 5 litres est rempli d'eau à une température de 22 +/-1°C avec une profondeur d'environ 20 cm. Chaque animal est placé dans l'eau pendant 6mn. Une caméra vidéo couplée à un ordinateur (logiciel Viewpoint) permet la mesure de la durée du comportement de flottement en utilisant un clavier éthologique. Le flottement est défini comme l'absence de mouvement à l'exception de ceux permettant le maintien de la tête hors de l'eau. Il est considéré comme reflétant l'état de résignation de l'animal.

Labyrinthe en Y

Ce test utilise un labyrinthe en forme de Y, composé de 3 bras (A, B et C) de tailles identiques disposés à 120° les uns des autres, sous une intensité lumineuse de 100 lux. Chaque animal est placé individuellement pendant 5 minutes dans ce dispositif qu'il peut explorer librement (procédure dite « continue ») et on note la succession des bras visités. La réalisation d'alternance spontanée est considérée comme une mesure de la composante spatiale de la mémoire de travail. Les rongeurs présentent une tendance naturelle à explorer leur environnement. Dans un labyrinthe en Y, les animaux explorent de préférence le bras le moins récemment visité, et tendent ainsi à visiter successivement chacun des 3 bras (exemples de séquences d'alternance spontanée : ABC, BCA,

CAB). Le % d'alternance spontanée est défini par le ratio entre le nombre d'alternances réalisées sur le nombre d'alternances possibles (c'est-à-dire le nombre de bras visités moins 2) x100 (Sarter et al., 1988). Le nombre de bras visités est considéré comme une mesure d'activité locomotrice (Mandillo et al., 2008; Wall et al., 2003).

Préférence pour le sucrose

Lors de chaque session de ce test, chaque souris est hébergée en cage individuelle pendant 16 heures, de 17h à 9h. Dans chaque cage individuelle, deux biberons (un biberon d'eau et un biberon d'eau sucrée, dont les positions sont alternées d'une nuit sur l'autre) et de la nourriture sont disponibles *ad libitum*. Entre les sessions, les animaux retrouvent leurs conditions d'hébergement habituelles, ce qui minimise la composante stressante du test.

L'expérience de préférence pour le sucrose se déroule de la manière suivante : une première nuit d'habituation au nouvel environnement (cage individuelle), puis 2 nuits de test pour chaque concentration de sucrose (par ordre croissant de concentration). Les concentrations de sucrose utilisées varient considérablement selon le génotype des souris étudiées (adapté de (Pothion et al., 2004). Nous avons utilisé comme concentrations de sucrose: 0,8% pour les souris de fond génétique pur C57BL/6J; 2,5% et 3,5% pour les souris de fond mixte 129SvPas-C57BL/6J 50-50%. Basé sur des expériences préliminaires, ces concentrations ont été choisies comme induisant une préférence significative (statistiquement différente de 50%) chez des souris naïves du fond génétique correspondant.

Les animaux et les biberons sont pesés avant et après chaque session. On mesure ainsi la consommation de sucrose pour chaque individu. Afin d'éviter d'éventuels biais liés au poids des animaux entre groupes expérimentaux, cette consommation totale de sucrose est normalisée par le poids des animaux (mg sucrose/g de poids corporel) (Ferguson and Boctor, 2010). On mesure également la préférence pour la solution sucrée, définie comme le rapport : volume de solution sucrée consommé/volume total (eau & solution sucrée) de liquide consommé x100. Cette préférence pour le sucrose est un comportement spontané chez les rongeurs, considérée comme une mesure de l'état hédonique des animaux (Strekalova et al., 2004).

Analyse statistique

Les résultats sont exprimés et présentés sous la forme de la moyenne ± l'erreur standard. Pour la comparaison des moyennes entre groupes, une analyse de la variance (ANOVA) appropriée au design expérimental est utilisée. Ainsi, pour l'analyse de l'évolution du poids des animaux au cours du traitement escaladant et de l'abstinence, on utilise une analyse de la variance (ANOVA) à mesures répétées. Le facteur temps est un facteur intra-individuel (*within-subject*) et le traitement héroïne un facteur interindividuel (*between-subject*). Pour l'analyse du poids des animaux, chaque durée d'abstinence est analysée séparément. Pour les tests comportementaux, les facteurs analysés sont le traitement (héroïne/saline) et la durée d'abstinence (1, 4 ou 7 semaines). L'effet de chaque durée d'abstinence ayant été analysé sur des cohortes d'animaux séparées, il s'agit d'un facteur interindividuel (between-subject).

b) Résultats

Poids des souris au cours du traitement héroïne et de l'abstinence

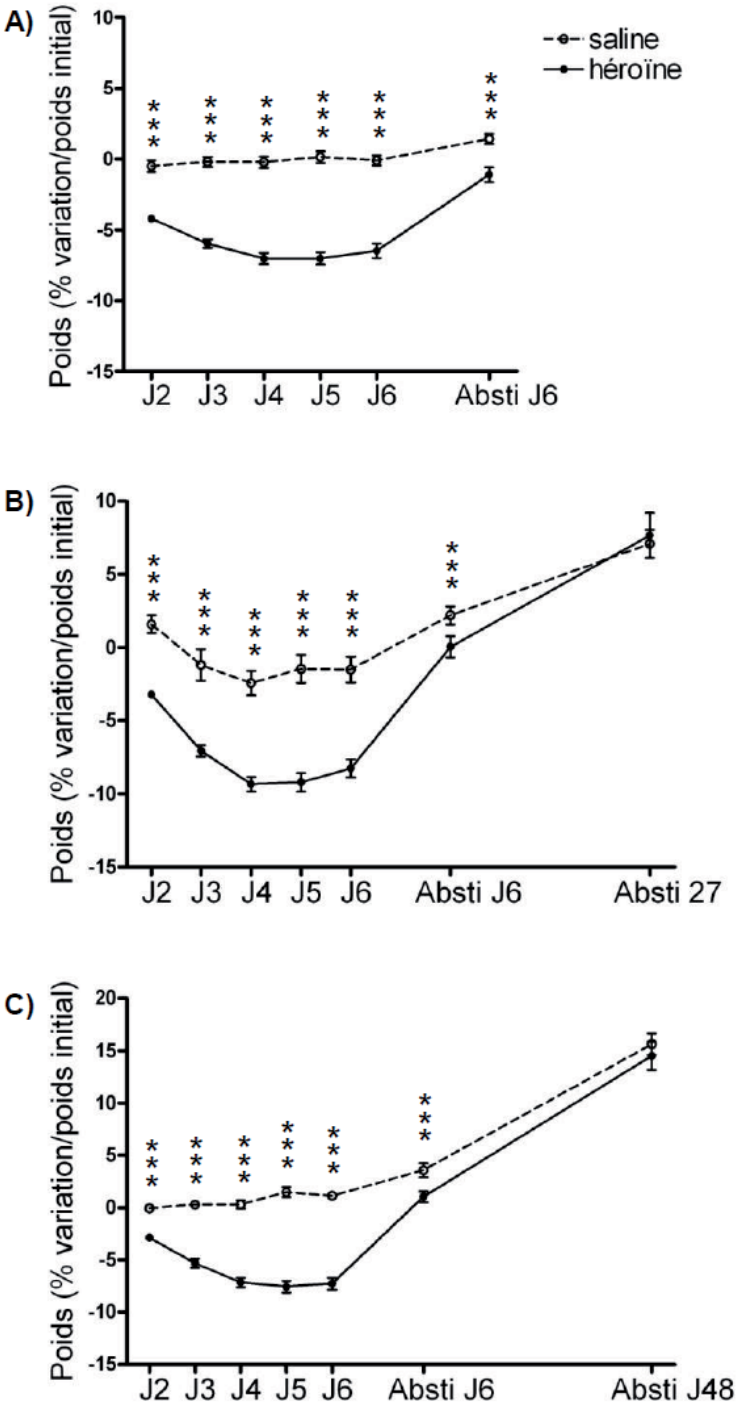


Figure 15. Evolution du poids des souris au cours du traitement héroïne et de l'abstinence. Les souris reçoivent deux fois par jour des injections d'héroïne (10 à 50 mg/kg) ou de solution saline, pendant 5 jours, et reçoivent une injection unique le dernier jour (J1 à J6). Les souris sont pesées

pendant le traitement et au cours de une (**A**), quatre (**B**) ou sept (**C**) semaines d'abstinence (Absti J6, Absti J27 et Absti J48). Des groupes indépendants de souris sont suivis pour chaque durée d'abstienence. N=24/ condition expérimentale (saline-héroïne)/durée d'abstinence. Les résultats sont présentés sous la forme de la moyenne ± l'erreur standard. *** p<0,001 indique un effet significatif de l'abstinence à l'héroïne.

La figure 15 montre l'évolution du poids des animaux au cours du traitement héroïne escaladant et pendant l'abstinence. Pour les animaux abstinents pendant 1 semaine (figure 15A), l'analyse ANOVA indique que leur poids était fortement diminué lors du traitement héroïne [$F(1;230)=151,2$; $p<0,001$], et variait au cours du temps [$F(1;230)=54,5$; $p<0,001$], avec une interaction significative entre les 2 facteurs [$F(1;230)=23,2$; $p<0,001$]. L'analyse à postériori détecte un poids significativement diminué pendant les jours 2, 3, 4, 5 et 6 du traitement escaladant ($p<0.001$), ainsi qu'après 6 jours d'abstinence (Absti J6, $p=0,001$).

Pour les animaux abstinents pendant 4 semaines (figure 15B), l'analyse ANOVA indique que leur poids était fortement diminué lors du traitement héroïne [$F(1;230)=36,6$; $p<0,001$] et variait également au cours du temps [$F(1;230)=112,6$; $p<0,001$], avec une interaction significative entre les 2 facteurs [$F(1;230)=11,1$; $p<0,001$]. L'analyse à postériori détecte un poids significativement diminué pendant les jours 2, 3, 4, 5 et 6 du traitement escaladant ($p<0.001$), ainsi qu'après 6 jours d'abstinence (Absti J6, $p=0,030$). Après 4 semaines, il n'y avait plus de différence entre les 2 groupes saline et héroïne ($p=0,74$).

Pour les animaux abstinents pendant 1 semaine (figure 15C), l'analyse ANOVA indique que leur poids était fortement diminué lors du traitement héroïne [$F(1;230)=98,31$; $p<0,001$], et variait au cours du temps [$F(1;230)=319,2$; $p<0,001$], avec une interaction significative entre les 2 facteurs [$F(1;230)=17,7$; $p<0,001$]. L'analyse à postériori détecte un poids significativement diminué pendant les jours 2, 3, 4, 5 et 6 du traitement escaladant ($p<0,001$), ainsi qu'après 6 jours d'abstinence (Absti J6, $p=0,0059$). Après 4 semaines, il n'y avait plus de différence entre les 2 groupes saline et héroïne ($p=0,50$).

Ainsi, dans l'ensemble de ces 3 groupes d'animaux abstinents pour des durées variables, nous avons observé qu'après 6 jours d'abstinence, les animaux ayant reçu des injections d'héroïne présentent un poids diminué par rapport aux souris contrôles. Puis, après 4 ou 7 semaines d'abstinence, cette différence n'était plus détectable.

Champ ouvert

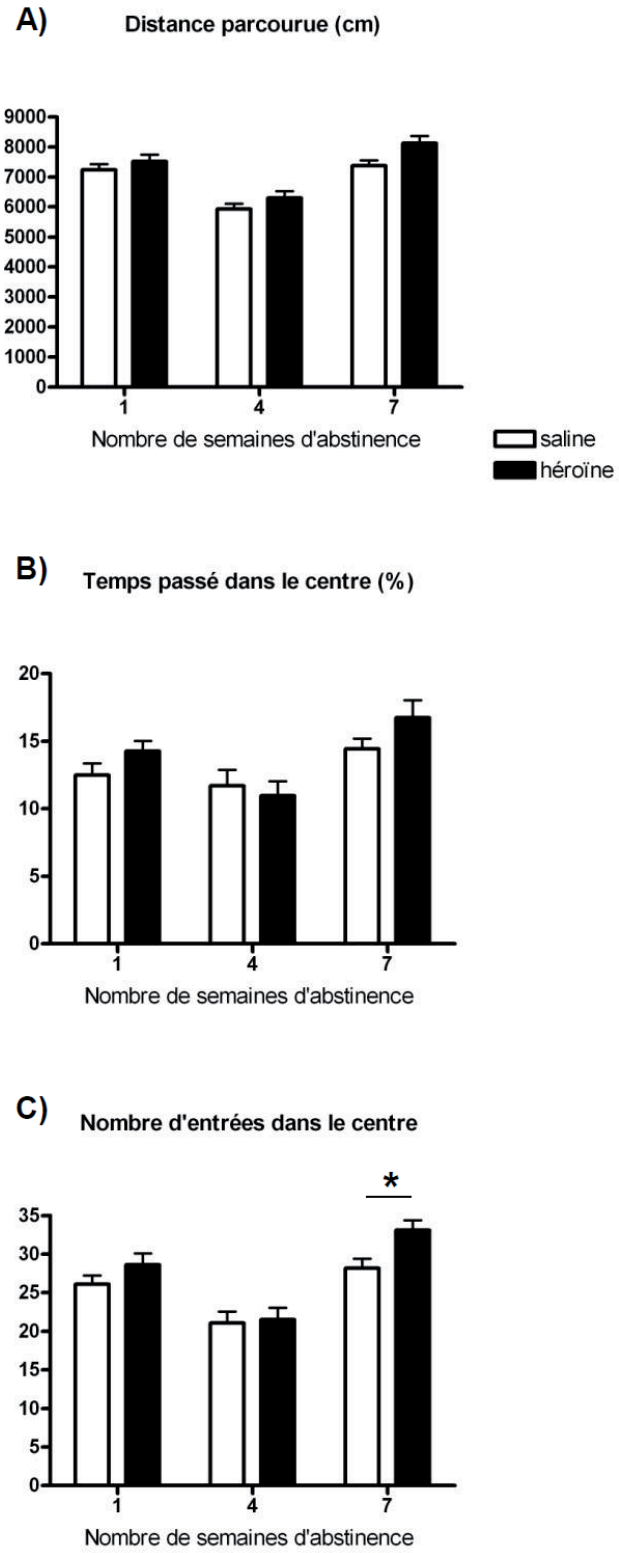


Figure 16. Mesure d'un comportement de type anxieux dans le test du champ ouvert au cours de l'abstinence à l'héroïne. Une, quatre et sept semaines après le traitement chronique à la solution saline (barre blanche) ou à l'héroïne (barre noire) les souris sont testées dans le champ ouvert et la

distance parcourue (**A**), le temps passé au centre du champ (**B**) et le nombre d'entrée dans le centre (**C**) sont mesurés. Des groupes indépendants de souris sont suivis pour chaque durée d'abstienence. N=24/ condition expérimentale (saline-héroïne)/durée d'abstinence. Les résultats sont présentés sous la forme de la moyenne ± l'erreur standard. * p<0,05 indique un effet significatif de l'abstinence à l'héroïne.

La figure 16 représente l'effet de l'héroïne après 1, 4 ou 7 semaines d'abstinence dans le test de la boîte claire-obscure. La **distance parcourue** (figure 16A) au cours des 15 premières minutes du test était significativement affectée par le traitement héroïne [F(1;135)=7,8; p=0,006]. La durée d'abstinence a également un effet significatif sur ce paramètre [F(2;135)=34,8; p<0,001], mais les 2 facteurs n'interagissent pas [F(2;135)=0,75; p=0,47]. Les comparaisons 2 à 2 indiquent que les souris abstinentes depuis 4 semaines (traitements saline et héroïne confondus) parcouraient une distance plus faible que les souris des groupes 1 (p<0,001) et 7 semaines (p<0,001).

L'ANOVA montre que l'abstinence à l'héroïne était sans effet sur le **% de temps passé dans le centre** de l'arène [F(1;135)=1,9; p=0,17], considéré comme anxiogène (figure16B). Par contre, la durée d'abstinence modifie ce paramètre [F(2;135)=9,0; p<0,001]. Il n'y a pas d'interaction entre ces 2 facteurs [F(2;135)=1,3; p=0,27]. Les comparaisons 2 à 2 indiquent que toutes les comparaisons entre les 3 durées d'abstinence sont significatives : 1 versus 4 semaines, p=0,039 ; 1 versus 7 semaines, p=0,036 ; 4 versus 7 semaines, p<0,001.

Le **nombre d'entrées dans le centre (**figure 16C**)** était significativement augmenté par l'abstinence à l'héroïne [F(1;135)=5,4; p=0,021]. La durée d'abstinence a également un effet significatif sur ce paramètre [F(2;135)=23,6; p<0,001], mais les 2 facteurs n'interagissent pas [F(2;135)=1,3; p=0,27]. L'analyse à postériori montre que cet effet de l'héroïne n'est significatif que chez les souris abstinentes depuis 7 semaines.

Interactions sociales

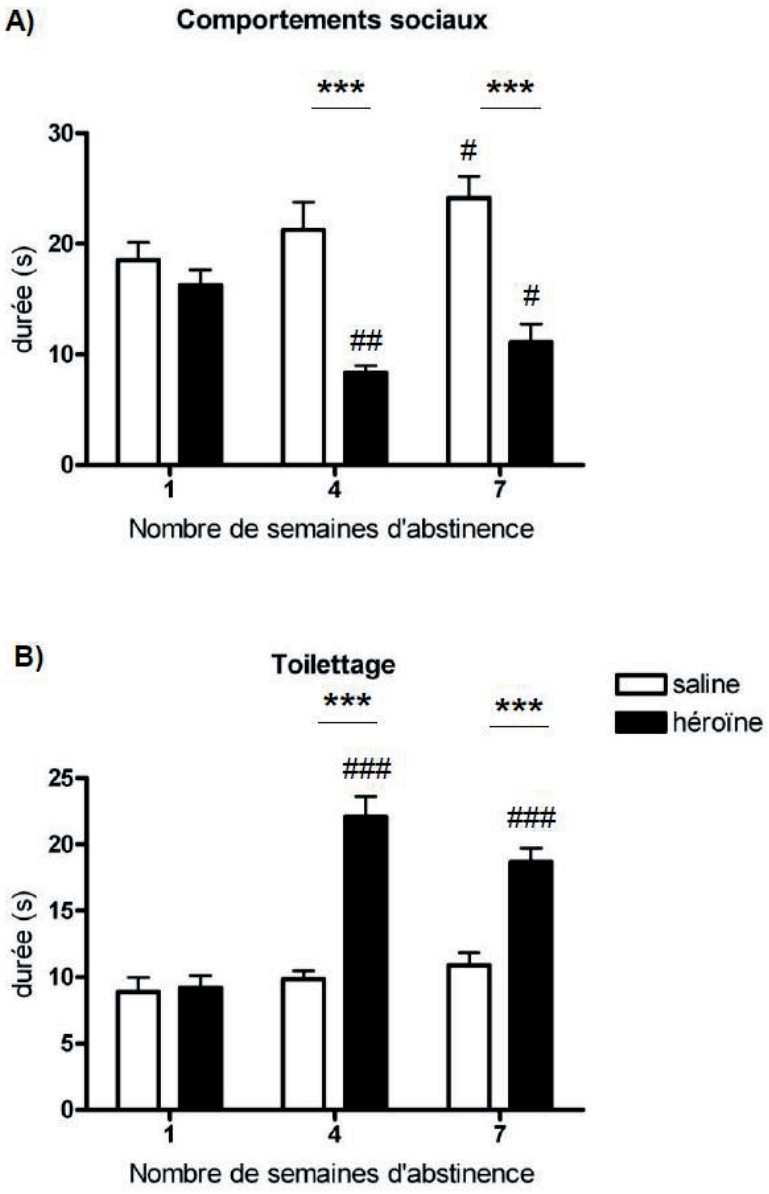


Figure 17. Mesure des effets de l'abstinence à l'héroïne sur les interactions sociales. Une, quatre et sept semaines après le traitement chronique à la solution saline (barre blanche) ou à l'héroïne (barre noire) des couples de souris (non familières, mais issues de la même condition expérimentale) sont testés pour leurs comportements sociaux (reniflement, poursuite et contacts physiques) (**A**). Le comportement individuel de toilettage est également mesuré (**B**). Des couples indépendants de souris sont étudiés pour chaque durée d'abstinence. N=12/condition expérimentale (saline-héroïne)/durée d'abstinence. Les résultats sont présentés sous la forme de la moyenne ± l'erreur standard. *** $p<0,001$ indique un effet significatif de l'abstinence à l'héroïne, # $p<0,05$, ## $p<0,01$, ### $p<0,001$ indiquent un effet significatif par rapport au groupe correspondant à 1 semaine d'abstinence (analyses à postériori).

La figure 17 représente l'effet de l'héroïne après 1, 4 ou 7 semaines d'abstinence dans le test d'interaction sociale. La durée des **comportements sociaux** (figure 17A) était significativement diminuée lors de l'abstinence à l'héroïne [$F(1;64)=44,1$; $p<0,001$], un effet dépendant de la durée d'abstinence (interaction significative, [$F(2;64)=6,4$; $p=0,0029$]). La durée d'abstinence en elle-même était sans effet sur ce paramètre [$F(2;64)=1,7$; $p=0,20$]. Afin d'explorer l'interaction entre ces 2 facteurs, nous avons utilisé une analyse à postériori. Cette analyse indique que l'effet de l'héroïne est fortement significatif après 4 ($p<0,001$) et 7 ($p<0,001$) semaines d'abstinence, mais ne l'est pas après seulement 1 semaine d'abstinence ($p=0,35$). En outre, par rapport au groupe 1 semaine, la durée des comportements sociaux était significativement diminué chez les souris abstinentes à l'héroïne depuis 4 ($p=0,017$) ou 7 ($p=0,047$) semaines, alors que nous n'avons pas retrouvé cet effet chez les souris contrôles, groupes 1 versus 4 semaines ($p=0,27$). Au contraire, chez les souris saline, la durée des comportements sociaux était augmentée 7 semaines après les injections par rapport au groupe 1 semaine ($p=0,023$).

La durée du comportement de **toilettage** (figure 17B) est significativement modifiée par l'abstinence à l'héroïne [$F(1;64)=59,0$; $p<0,001$], avec une interaction significative avec la durée d'abstinence [$F(2;64)=16,1$; $p<0,001$]. La durée d'abstinence a également un effet significatif sur ce paramètre [$F(2;64)=24,0$; $p<0,001$]. L'analyse à postériori révèle que le toilettage est augmenté par l'abstinence à l'héroïne après 4 ($p<0,001$) et 7 ($p<0,001$) semaines d'abstinence, mais pas après seulement 1 semaine ($p=0,84$). Par rapport au groupe 1 semaine, la durée du comportement de toilettage était augmentée chez les souris abstinentes à l'héroïne depuis 4 ($p<0,001$) ou 7 ($p<0,001$) semaines, alors que nous n'avons pas retrouvé cet effet chez les souris contrôles (1 versus 4 semaines, $p=0,53$ et 1 versus 7 semaines, $p=0,19$). Enfin, notons que la durée du toilettage diminuait entre 4 et 7 semaines d'abstinence chez les souris traitées à l'héroïne ($p=0,036$).

Suspension caudale

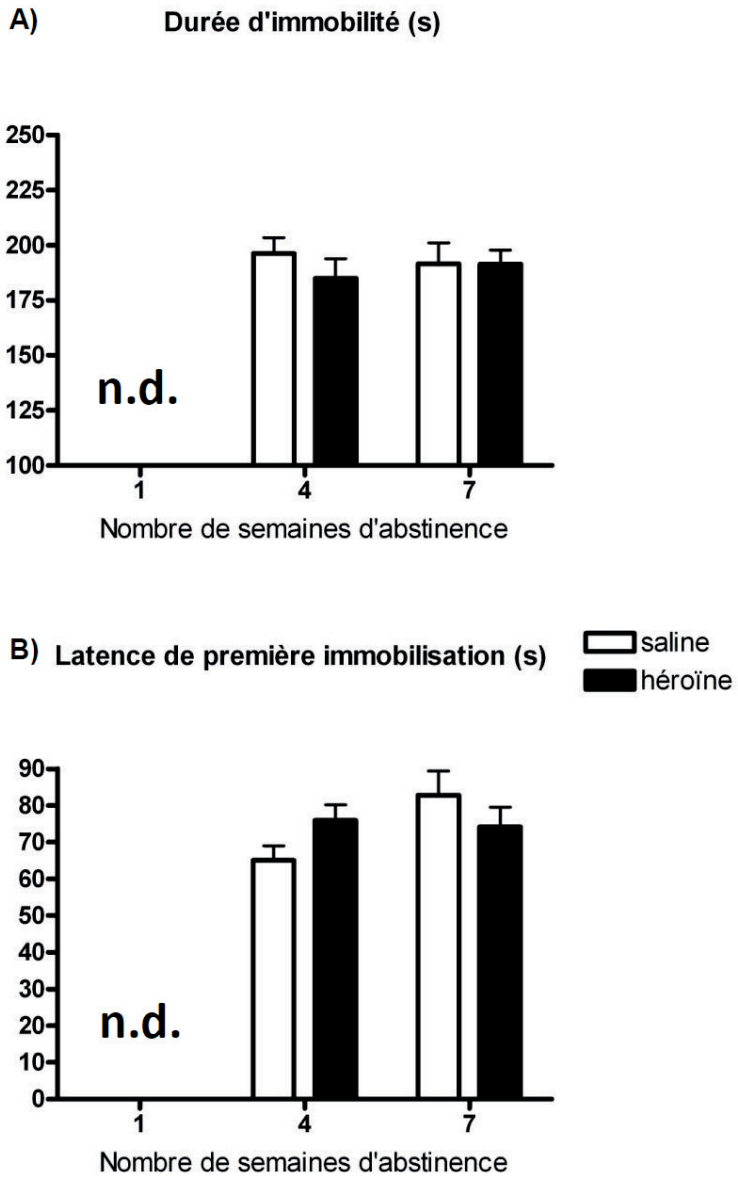


Figure 18. Mesure d'un comportement de type dépressif dans le test de la suspension caudale au cours de l'abstinence à l'héroïne. Quatre et sept semaines après le traitement chronique à la solution saline (barre blanche) ou à l'héroïne (barre noire) les souris sont suspendues par la queue pendant 6 minutes et la durée de l'immobilité (**A**) ainsi que la latence de première immobilisation (**B**) sont mesurées. Des cohortes indépendantes de souris sont étudiées pour chaque durée d'abstinence. N=24/condition expérimentale (saline-héroïne)/durée d'abstinence. Ce test n'a pas été réalisé après une semaine d'abstinence (n.d.). Les résultats sont présentés sous la forme de la moyenne ± l'erreur standard.

Dans le test de la suspension caudale, l'analyse statistique ne retrouve pas d'effet sur la **durée d'immobilité** (figure 18A) du traitement héroïne [F(1;89)=0,46; p=0,50]. Il n'y avait pas d'effet de la durée d'abstinence [F(1;89)=0,009; p=0,92], ni d'interaction entre les 2 facteurs [F(1;89)=0,45; p=0,50].

De même, la **latence de première immobilisation** (figure 18B) n'était pas modifiée : traitement, [F(1;89)=0,044; p=0,83]; durée d'abstinence, [F(1;89)=2,5; p=0,12] et interaction, [F(1;89)=3,7; p=0,058].

Nage forcée

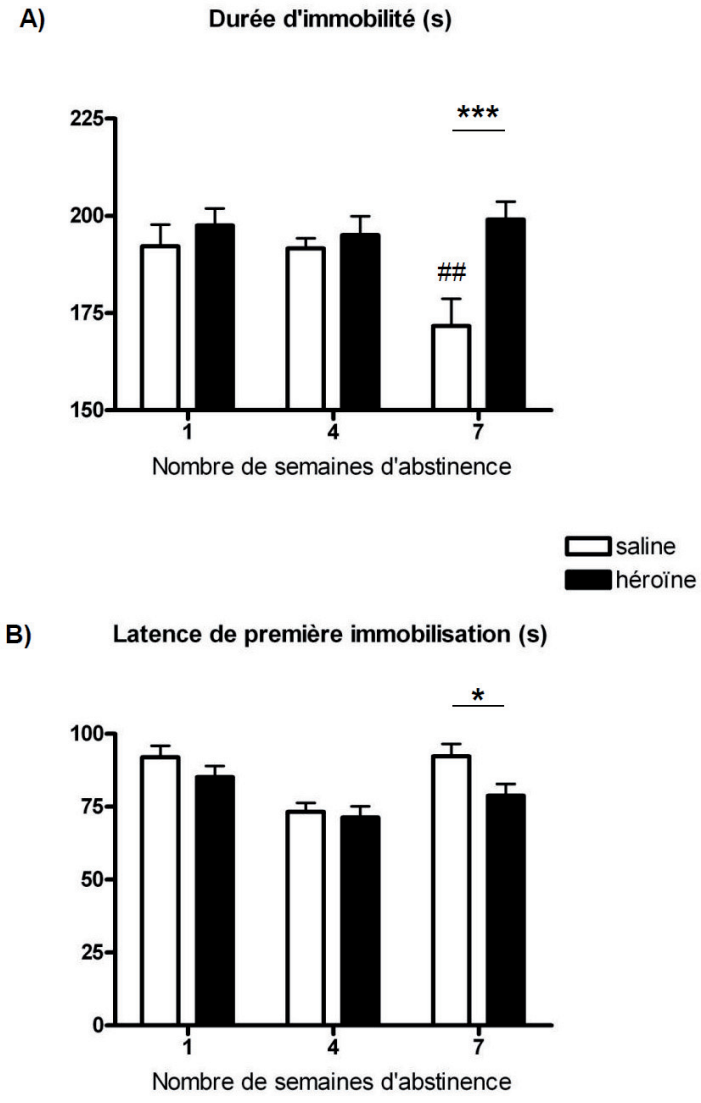


Figure 19. Mesure d'un comportement de type dépressif dans le test de la nage forcée au cours de l'abstinence à l'héroïne. Une, quatre et sept semaines après le traitement chronique à la solution saline (barre blanche) ou à l'héroïne (barre noire) les souris sont placées dans un bain d'eau pendant 6 minutes et la durée de l'immobilité (**A**) ainsi que la latence de première immobilisation (**B**) sont mesurées. Des groupes indépendants de souris sont suivis pour chaque durée d'abstinence.

N=24/ condition expérimentale (saline-héroïne)/durée d'abstinence. Les résultats sont présentés sous la forme de la moyenne ± l'erreur standard. * p<0,05, *** p<0,001 indiquent un effet significatif de l'abstinence à l'héroïne, ## p<0,01 indique un effet significatif par rapport au groupe correspondant à 1 semaine d'abstinence (analyses à postériori).

Dans le test de la nage forcée, l'ANOVA montre que la **durée d'immobilité** (figure 19A) était significativement modifiée sous l'effet du traitement héroïne [F(1;135)=5,4; p=0,021], un effet dépendant de la durée d'abstinence, comme indiqué par leur interaction [F(2;135)=3,4; p=0,038]. En revanche, la durée d'abstinence était sans effet [F(2;135)=2,0; p=0,14]. L'analyse à postériori confirme que la durée d'immobilité était augmentée chez les souris abstinentes à l'héroïne depuis 7 semaines (p<0,001), un effet qui n'apparait pas après des durées plus courtes d'abstinence (1 semaine, p=0,45 ; 4 semaines, p=0,63). Enfin, la durée d'immobilité diminuait significativement dans les groupes saline au cours de l'abstinence (1 versus 7 semaines, p=0,0045) mais pas dans le groupe héroïne (1 versus 7 semaines, p=0.84)

Pour la **latence de première immobilisation** (figure 19B), l'analyse statistique révèle un effet significatif de l'héroïne [F(1;135)=5,4; p=0,021] et de la durée d'abstinence [F(2;135)=10,2; p<0,001], mais aucune interaction [F(2;135)=1,1; p=0,33]. Bien que l'analyse ANOVA ne détecte pas d'interaction, la diminution de la latence de première immobilisation chez les souris ayant reçu un traitement héroïne semble essentiellement se produire après 7 semaines d'abstinence L'analyse à postériori montre que cet effet est effectivement significatif à 7 semaines (p=0.018), mais après 1 (p=0.21) ou 4 (p=0.73) semaines d'abstinence, un résultat similaire à celui obtenu pour la durée d'immobilité. Notons également que la latence de première immobilisation est diminuée dans le groupe saline abstinent depuis 4 semaines par rapport aux groupes saline abstinents depuis 1 (p<0,001) ou 7 (p<0,001) semaines. Enfin, la latence est augmentée dans le groupe héroïne abstinent depuis 1 semaines par rapport correspondant à 4 semaines d'abstinence (p=0,012).

Labyrinthe en Y

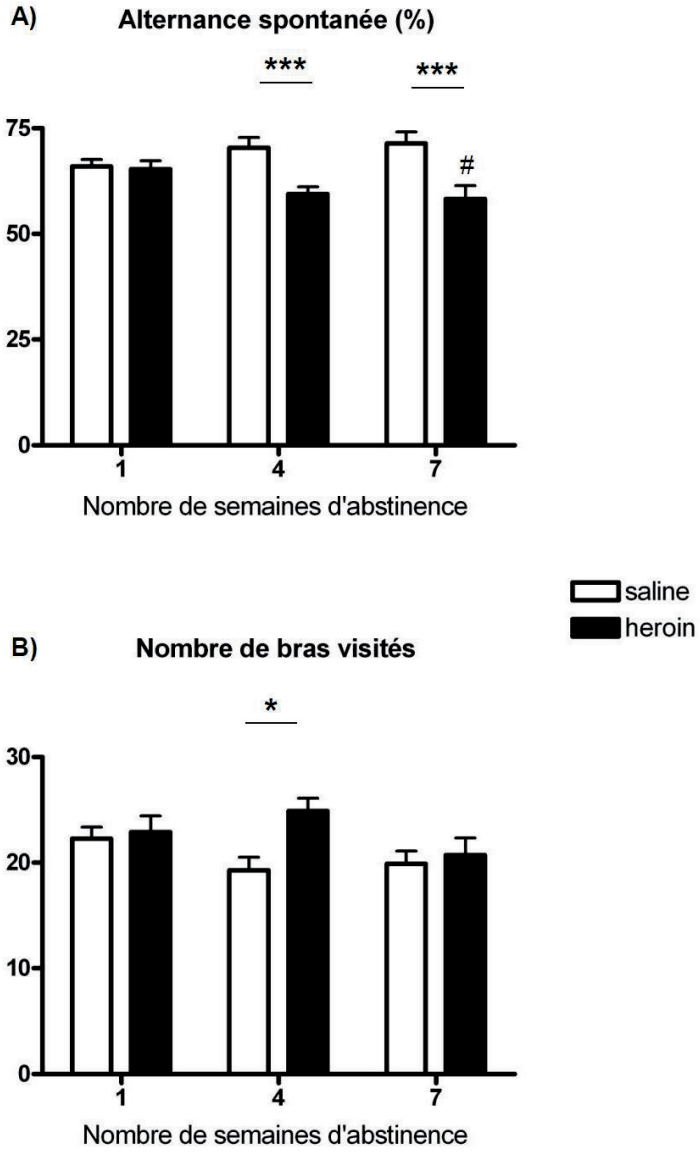


Figure 20. Mesure de la mémoire de travail spatiale dans le test du labyrinthe en Y au cours de l'abstinence à l'héroïne. Une, quatre et sept semaines après le traitement chronique à la solution saline (barre blanche) ou à l'héroïne (barre noire) les souris sont placées dans un labyrinthe en Y et l'alternance spontanée entre les 3 bras (**A**) ainsi que le nombre de bras visités (**B**) sont mesurés. Des groupes indépendants de souris sont suivis pour chaque durée d'abstinence. N=24/condition expérimentale (saline-héroïne)/durée d'abstinence. Les résultats sont présentés sous la forme de la moyenne ± l'erreur standard. * $p<0,05$, *** $p<0,001$ indiquent un effet significatif de l'abstinence à l'héroïne, # $p<0,05$ indique un effet significatif par rapport au groupe correspondant à 1 semaine d'abstinence (analyses à postériori).

L'ANOVA révèle dans le test du labyrinthe en Y, sur le **% d'alternance spontanée** (figure 20A), en effet significatif du traitement héroïne [F(1;135)=19,2; p<0.001], ainsi qu'une interaction avec la durée d'abstinence [F(2;135)=4,2; p=0,017], qui isolément est sans effet [F(2;135)=0,07; p=0,93]. L'analyse à postériori montre que la performance d'alternance spontanée était significativement diminuée chez les souris héroïne par rapport au groupe contrôle à 4 (p<0,001) et 7(p<0,001) semaines d'abstinence, mais pas à 1 semaine (p=0,84). De plus, cette performance était diminuée chez les souris héroïne entre 1 et 7 semaines d'abstinentes (p=0,036), mais pas chez les souris contrôles entre ces 2 mêmes durées d'abstinence (p=0,092).

L'analyse statistique indique en outre que le **nombre d'entrées** (figure 20B) dans le labyrinthe en Y était modifié par le traitement héroïne [F(1;135)=1,6; p=0,20]. L'analyse ne retrouve pas d'effet principal de la durée d'abstinence [F(2;135)=0,07; p=0,93] et pas d'interaction entre les 2 facteurs [F(2;135)=2,4; p=0,098]. Malgré l'absence d'interaction entre facteur lors de l'analyse ANOVA, l'effet de l'héroïne sur le nombre d'entrées dans le labyrinthe semble concerner essentiellement les groupes à 4 semaines. Les comparaisons à postériori montrent effectivement que les souris héroïne différaient des souris contrôles à 4 (p=0,027), mais pas à 1 (p=0,75) ou 7 (p=0,67) semaines d'abstinence.

Afin d'explorer le lien possible entre activité locomotrice et performance d'alternance spontanée, nous avons réalisé une analyse de régression linéaire entre ces variables, séparément pour les souris des groupes saline et héroïne. Le calcul de régression linéaire montre que ces 2 variables ne sont pas corrélées linéairement, aussi bien dans le groupe héroïne (r^2=0,0025 ; [F(1;22)=0,055; p=0,82]) que dans le groupe contrôle (r^2=0,0033 ; [F(1;22)=0,072; p=0,79]).

Préférence pour le sucrose

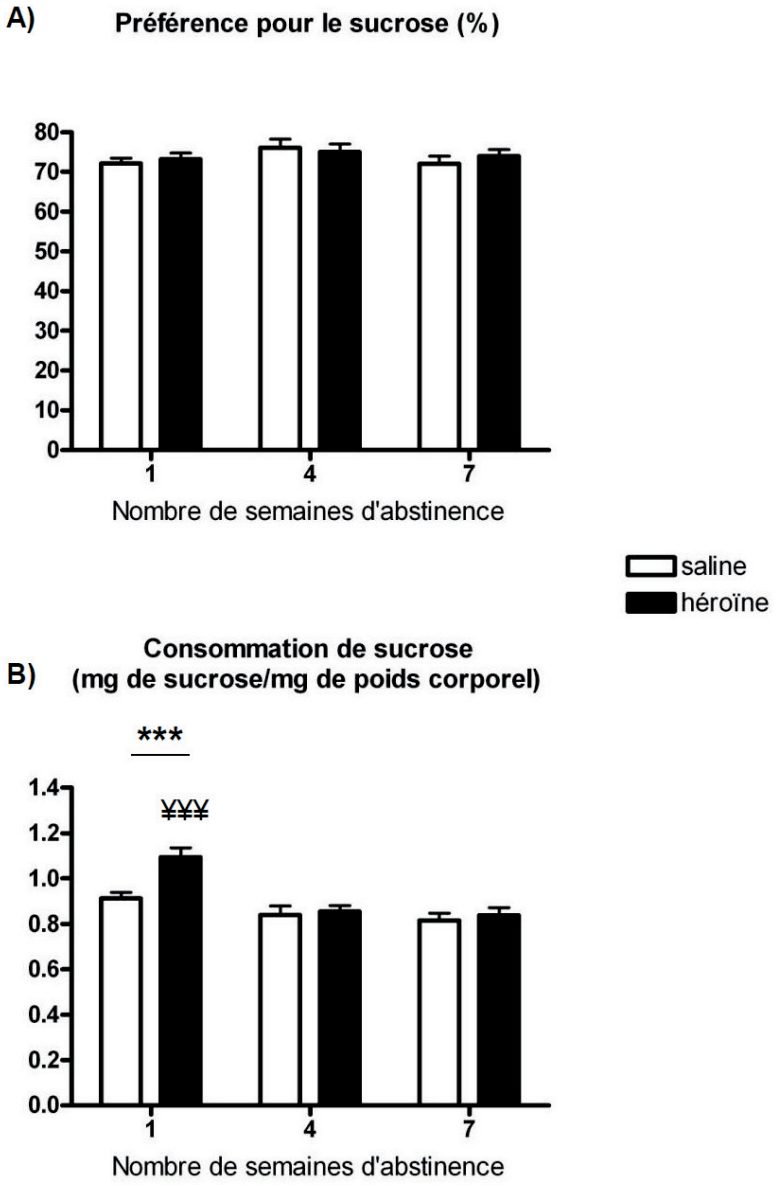


Figure 21. Mesure de la préférence pour le sucrose au cours de l'abstinence à l'héroïne. Une, quatre et sept semaines après le traitement chronique à la solution saline (barre blanche) ou à l'héroïne (barre noire) la préférence pour le sucrose est évaluée (**A**) et la consommation de sucrose calculée pour chaque souris (**B**). Des groupes indépendants de souris sont suivis pour chaque durée d'abstinence. N=24/condition expérimentale (saline-héroïne)/durée d'abstinence. Les résultats sont présentés sous la forme de la moyenne ± l'erreur standard. *** $p<0,001$ indique un effet significatif de l'abstinence à l'héroïne, ¥¥¥ $p<0,001$ indique un effet significatif par rapport aux groupes héroïne à 4 et 7 semaines d'abstinence (analyses à postériori).

Le **pourcentage de préférence pour le sucrose** (figure 21A) ne variait pas en fonction du traitement héroïne [F(1;130)=0,16; p=0,69], ni selon la durée d'abstinence [F(2;130)=1,6; p=0,21]. Il n'y avait pas non plus d'interaction entre ces 2 facteurs [F(2;130)=0,36; p=0,70].

Par contre, l'analyse statistique montre que la **consommation de sucrose** (figure 21B) était modifiée par le traitement héroïne [F(1;130)=6,8; p=0,010] et par la durée d'abstinence [F(2;130)=16,7; p<0,001], avec une interaction significative [F(2;130)=3,9; p=0,024]. L'analyse à postériori montre que la consommation de sucrose était augmentée par rapport aux groupes contrôles chez les souris héroïne après 1 semaine (p<0,001), mais pas après 4 (p=0,76) ou 7 (p=0,64) semaines d'abstinence. La consommation de sucrose diminuait au cours des premières semaines d'abstinence chez les souris héroïne (1 semaine versus 4 semaines, p<0,001), mais pas chez les souris contrôles (1 semaine versus 4 semaines, p=0,12).

c) Discussion

L'activation du récepteur opioïde mu lors d'une injection systémique d'un opiacé induit un ensemble d'effets chez la souris, dont une analgésie, une contracture musculaire généralisée se traduisant notamment par un réflexe de redressement de la queue (*Straub tail*) et une stimulation locomotrice qui dure plusieurs heures. La perte progressive de poids au cours de l'induction de la dépendance est classiquement observée suite aux injections biquotidiennes intermittentes de doses croissantes de morphine (el-Kadi and Sharif, 1994; Kest et al., 2001). Par exemple, une perte de poids de l'ordre de 10 à 15% a été décrite suite à un régime d'injection de ce type chez la souris C57BL6J (Papaleo and Contarino, 2006). Cette diminution peut être en partie attribuée à une activation de l'axe HHS et à une réduction de la prise alimentaire (Houshyar et al., 2003) ou à une dépense énergétique supérieure consécutive à la stimulation locomotrice. Dans la présente étude, nous avons observé une forte diminution du poids des animaux lors du traitement héroïne, de l'ordre de 7 à 10% (figure 15), tout à fait comparable avec nos résultats précédents lors d'un traitement morphinique escaladant (voir l'article 2). Il est intéressant de noter que dans nos 3 groupes d'animaux abstinents pour des périodes de 1, 4 ou 7 semaines, nous avons observé des cinétiques d'évolution du poids très similaires au décours des injections répétées. Ainsi, les souris ayant reçu des injections d'héroïne retrouvent progressivement au cours de l'abstinence un poids comparable aux souris contrôles. A l'issue de la première semaine d'abstinence, ce rattrapage est encore incomplet et il persiste une différence significative entre ces 2 groupes. Puis après 4 semaines, et à fortiori après 7 semaines, les 2 groupes de souris présentent des poids similaires. Cette différence de poids après 1 semaine d'abstinence semble influer sur le comportement des animaux dans le test de la préférence pour le sucrose (figure 21). Dans ce test, nos résultats montrent une augmentation de la consommation de sucrose (rapportée au poids des animaux) chez les souris abstinentes à l'héroïne depuis 1 semaine. Lorsque le poids des groupes saline et héroïne redevient similaire, après 4 et 7 semaines d'abstinence, cette différence de consommation de sucrose n'est plus détectée. Ce résultat pourrait traduire une augmentation de la motivation pour un renforçateur naturel ou une augmentation du tonus hédonique.

Ces 2 hypothèses nous paraissent peu plausibles. Les animaux abstinents ne montrent pas de modification des réponses comportementales de type dépressif après une semaine d'abstinence, dans nos conditions (voir plus loin). De plus chez le rat, la PPC pour la nourriture est diminuée après 2 et 5 semaines d'abstinence à la morphine (Harris and Aston-Jones, 2003). Bien qu'obtenu dans des conditions expérimentales (traitement morphinique chronique par implantation sous-cutanée de pastilles de morphine) et une espèce (chez le rat) différentes, ce résultat suggère que l'effet renforçant de la nourriture, un stimulus naturel proche du sucrose, est diminué au cours de l'abstinence à la morphine. De plus, en conditionnement opérant la motivation pour une solution de sucrose est diminuée au cours des 10 permiers jours du sevrage morphinique (Zhang et al., 2007). De façon alternative, étant données les propriétés caloriques du sucrose, l'augmentation de la consommation de sucrose observée pourrait correspondre à une augmentation transitoire des ingestats au cours de l'abstinence, qui pourrait traduire un effet métabolique compensateur suite à la perte de poids lors du traitement héroïne. Il serait intéressant d'étudier chez les animaux abstinents depuis 1 semaine la préférence pour la saccharine, qui comme le sucrose est appétitive, mais ne représente aucun apport calorique.

Afin de documenter davantage les effets immédiats de notre protocole de traitement héroïne escaladant, nous sommes actuellement en train d'évaluer l'intensité du sevrage précipité par injection de naloxone au décours immédiat de la dernière injection. Considérant les données de la littérature que nous avons déjà mentionnées, il est très probable que notre protocole induit une dépendance physique robuste. Notamment, nous avons systématiquement observé lors de la manipulation des animaux, juste avant chaque nouvelle injection, des signes de sevrage spontané discrets (diarrhées). Le sevrage précipité à l'héroïne pourrait notamment se révéler qualitativement différent (types de signes de sevrage) du sevrage précipité morphinique.

La distinction entre sevrage et abstinence est mal définie. Le sevrage proprement dit correspondrait à la symptomatologie accompagnant la désintoxication, c'est-à-dire l'élimination progressive du composé suite à la dernière administration. Après traitement morphinique chronique (20 à 100 mg/kg), les signes de sevrage spontané (en l'absence d'injection d'antagoniste) durent jusqu'à 56h après la dernière injection chez la souris de souche C57BL/6J (Papaleo and Contarino, 2006). Ainsi, suite à l'induction de la dépendance physique à l'héroïne, les symptômes de sevrage spontané pourraient persister plusieurs jours dans nos conditions. Ce syndrome de sevrage se caractérise également par des signes de sevrage affectif et motivationnel, qui pourraient également avoir des conséquences à long terme sur la régulation émotionnelle. L'état affectif et motivationnel qui accompagne le sevrage physique est habituellement évalué par les comportements d'évitement du contexte associé au sevrage précipité par la naloxone (aversion de place conditionnée, APC) ou les comportements associés à un état d'anxiété augmentée (Castilho et al., 2008; Harris and Aston-Jones, 1993b; Harris and Aston-Jones, 2001; Schulteis et al., 1998). De tels déficits sont décrits même dans une situation de sevrage précipité consécutif à une injection unique de morphine (Azar et al., 2003; Liu and Schulteis, 2004). Ces modifications rapportées pendant l'expérience aversive du sevrage physique pourraient donc refléter plus généralement des réponses compensatoires aiguës, secondaires au blocage de la transmission opioïdergique. Pourtant ces réponses sont décrites comme

persistantes dans des modèles de PPC à la morphine ou d'APC (Harris and Aston-Jones, 2003; Mueller et al., 2002; Stinus et al., 2000), et pourraient même s'accentuer dans le temps (Sakoori and Murphy, 2005; White et al., 2005) suggérant que des mécanismes d'adaptation se développent au long cours suite à l'exposition aux opiacés. Nous avons ainsi choisi de placer notre étude au-delà des symptômes aigus de sevrage physique et d'étudier les conséquences à long terme de l'abstinence à l'héroïne sur les fonctions émotionnelles.

Nous mettons ici en évidence que quelle que soit la durée d'abstinence considérée, dans nos conditions les souris abstinentes à l'héroïne ne montrent pas de modification des comportements de type anxieux (champ ouvert, figure 16) dans le test du champ ouvert. Au contraire, nous observons une discrète tendance vers un effet de type anxiolytique, révélée par une augmentation du nombre d'entrées dans le centre du dispositif (un paramètre considéré comme un indice mineur de comportements de type anxieux (Parks et al., 1998; Popa et al., 2010)). Ce résultat est conforté par l'absence de conduites anxieuses exagérées dans les tests de la boîte claire/obscure (*light-dark*) ou du labyrinthe surélevé (*plus-maze*, données non présentées) après 4 semaines d'abstinence. Ces données sont concordantes avec celles de la littérature qui rapportent un état d'anxiété basale en réponse à une situation aversive pendant la période de sevrage (spontané ou précipité (Castilho et al., 2008; Harris and Aston-Jones, 1993a; Schulteis et al., 1998), mais non au cours de l'abstinence prolongée (Grasing et al., 1996). En effet, comme cela a été décrit lors de l'abstinence prolongée à d'autres drogues d'abus, une anxiété de trait semble difficile à révéler en conditions basales. Seules des réponses émotionnelles exagérées en réponse à un stress aigu sont décrites au cours d'une abstinence prolongée : dans le test d'enfouissement d'une sonde électrifiée après 2 semaines d'abstinence (Harris and Aston-Jones, 2001), suite à l'application d'un stress de contention, ou une injection de CRH, dans le test du labyrinthe en croix surélevé après 1 semaine d'abstinence (Blatchford et al., 2005; Blatchford et al., 2006). Ceci suggère qu'une accentuation des réponses d'anxiété en réponse à un stress (anxiété d'état), mais non basales, peuvent être révélées chez des animaux abstinents à la morphine depuis 1 à 2 semaines.

Dans le test d'interaction sociale (figure 17) nous observons une perturbation des comportements sociaux chez les animaux abstinents à l'héroïne, avec une diminution de la durée des interactions et une augmentation des comportements de toilettage individuel. Ces 2 déficits semblent s'installer progressivement entre les semaines 1 et 4 d'abstinence, et persistent jusqu'à 7 semaines après la dernière injection. Le toilettage individuel effectué de manière répétée en présence d'un congénère non familier pourrait traduire un comportement compulsif effectué dans le but de faire face à la situation stressante en évitant l'interaction sociale (Kalueff and Tuohimaa, 2005). Nos données indiquent également le développement d'un déficit d'interaction sociale pendant les 4 semaines d'abstinence : la modification de ces deux paramètres lors de l'abstinence pourraient refléter des comportements anxieux (File and Seth, 2003; Lapiz-Bluhm et al., 2008). Cependant les conditions expérimentales utilisées ici (environnement familier, éclairage faible) minimisent la composante

anxiogène du test (File and Seth, 2003) et nous n'avons pas observé de modification des comportement de type anxieux chez les animaux abstinents à l'héroïne.

De façon alternative, ces anomalies du comportement social pourraient traduire une diminution de la motivation, une indifférence pour les stimuli sociaux. Ou encore une aversion sociale, un évitement actif de ces stimuli. A court terme, le sevrage opioïde précipité ou spontané favorise les comportements agressifs (Sukhotina, 2001). Pour différencier ces 2 interprétations quant au sevrage prolongé, il serait intéressant d'évaluer d'autres comportements sociaux chez ces animaux abstinents, comme leur réaction à la mise en présence avec un congénère non familier, dans leur cage d'hébergement (modèle de l'intrus et du résident, *resident-intruder*) (Cryan and Mombereau, 2004). Une agressivité accrue chez les animaux abstinents résidents traduirait alors une augmentation de la charge aversive des interactions sociales nouvelles. Le système opioïde joue un rôle important dans la promotion des comportements sociaux (maternels, grégaires, jeu social, statut social ; (Bodnar, 2011; Moles et al., 2004; Trezza et al., 2010)). Les stimuli sociaux sont considérés comme renforçants et sont suffisants pour instaurer une PPC chez le rongeur. Ainsi, ce retrait social pourrait refléter une perturbation du système opioïde au cours de l'abstinence. Comme nous le verrons dans l'expérience 3, le récepteur kappa participe de l'établissement de ce déficit comportemental.

Des déficits d'interactions sociales ont été mis en évidence chez la souris (Kompagne et al., 2008) dans des modèles de dépression comme le SCLI (Willner, 2005) ou sous la forme d'un évitement social, suite au stress social répété (Berton et al., 2006). Dans ce dernier cas, l'évitement social s'associe à une diminution de la préférence pour le sucrose (ou anhédonie). Ces données de la littérature suggèrent que les perturbations du comportement social observées lors de l'abstinence aux opiacés pourraient correspondre à des symptômes de type dépressif (Kompagne et al., 2008). Bien qu'aspécifique, une perturbation des activités sociales est décrite pour la dépression dans le DSM-IV et le retrait social accompagne les symptômes dépressifs chez l'homme (Kennedy et al., 2007; Tse and Bond, 2004).

Afin de confirmer un état émotionnel de type dépressif, nous avons évalué les comportements de résignation des souris abstinentes dans les tests de nage forcée, de la suspension caudale et de la préférence pour le sucrose. Les souris abstinentes ne se comportent pas différemment des souris du groupe saline en situation de suspension caudale (figure 18), et ne montrent pas de comportement anhédonique dans le test de la préférence pour le sucrose (figure 21). En revanche, nous avons observé une augmentation des comportements de résignation dans le test de la nage forcée après 7 semaines d'abstinence (figures 19A et 19B). Malgré une robuste validité prédictive pour détecter un potentiel antidépresseur de nouvelles molécules, ces deux tests (suspension caudale et nage forcée) engagent des substrats anatomiques et neurochimiques différents (Renard et al., 2003) et sont très sensibles au fond génétique chez la souris (Bai et al., 2001; Bourin et al., 2005). Il n'est pas rare de voir des différences de sensibilité entre ces deux tests en réponse à des manipulations expérimentales. En particulier la souche C57BL/6J peut montrer des réponses opposées dans ces deux tests suite à l'instauration d'un état de type dépressif dans le modèle de stress chronique (Mineur et al., 2006). Le test de la nage forcée nous permet ici de mettre en évidence l'apparition d'un comportement de résignation chez la souris abstinente à l'héroïne. Ces résultats prolongent ceux

d'études précédentes chez le rat, indiquant une augmentation des comportements de type dépressif chez des animaux abstinents à la morphine depuis 6 jours (Anraku et al., 2001) ou 2-3 semaines (Grasing and Ghosh, 1998). Ce déficit de type dépressif n'apparaît significatif qu'après une période de 7 semaines d'abstinence, indiquant un développement graduel de l'état d'abstinence et suggérant que l'exposition à des doses élevées d'opiacés peut avoir des conséquences à très long terme sur la régulation émotionnelle. En outre, dans nos conditions expérimentales, le retrait social constitue le signe avant-coureur de comportements de résignation plus spécifiques de la dépression. Nous verrons dans l'expérience 4 que le retrait social peut s'accompagner dès la 4ème semaine d'abstinence d'une anhédonie, lorsque l'abstinence à l'héroïne se trouve potentialisée par un facteur génétique de vulnérabilité (KO du récepteur delta, voir l'expérience 4).

Enfin, ces résultats montrent que l'abstinence à l'héroïne a des effets différents de ceux de l'abstinence à la morphine (voir l'article 2). Nous avions basé le choix des doses d'héroïne sur les données disponibles dans la littérature comparant l'intensité du sevrage précipité pour ces 2 composés. Nos résultats indiquent que pour les doses de morphine et d'héroïne utilisées dans nos études, la morphine induit plus rapidement (dès 4 semaines) que l'héroïne (7 semaines) l'apparition d'un comportement de type dépressif. Néanmoins nous avons retrouvé pour ces deux drogues un retrait social prononcé dès 4 semaines d'abstinence. Bien que correspondant à un symptôme aspécifique chez l'homme (caractérisant la dépendance aux substances psycho-actives, la dépression, mais aussi la phobie sociale ou la schizophrénie), ce phénotype s'associe plus ou moins rapidement selon la drogue utilisée (morphine ou héroïne) à un comportement de résignation apparenté à la dépression. Pour ces deux opiacés, nous n'avons retrouvé aucun effet comportemental orientant vers un état de type anxieux chez les animaux abstinents. Ainsi, l'ensemble de ces données sur l'abstinence aux opiacés permet de proposer un modèle murin de la comorbidité avec la dépression que nous avons abondamment décrite dans notre introduction. Se pose évidemment la question de la persistance dans le temps du phénotype observé, au-delà des durées d'abstinence que nous avons étudiées.

Outre les comorbidités émotionnelles, l'addiction se caractérise également par des troubles cognitifs, avec des altérations des fonctions exécutives et des processus d'apprentissage et de mémorisation, qui traduisent notamment un dysfonctionnement de structures corticales (voir introduction, chapitre IV, et (Ornstein et al., 2000)). Ces troubles mnésiques ont été caractérisés chez des usagers actifs et chez des sujets abstinents. Citons la diminution de l'empan mnésique verbal (une mesure expérimentale classique de la mémoire de travail) chez des usagers d'héroïne, qui persisterait, bien qu'atténuée, après 6 mois d'abstinence (Papageorgiou et al., 2001; Papageorgiou et al., 2004). Ce déficit s'accompagnerait d'anomalies mesurables des potentiels évoqués (mesurés au moyen d'électrodes disposées sur le scalp enregistrant des variations de potentiels électriques au cours de la réalisation de la tâche cognitive). Au cours des 15 premiers jours du sevrage opiacé, Rapeli et al ne retrouvait pas ce déficit de l'empan mnésique verbal (Rapeli et al., 2006), mais un déficit dans une tâche plus complexe (requérant la réalisation d'additions successives, en plus de la mémorisation transitoire de chiffres) qui régresserait progressivement.

Au cours de l'abstinence à l'héroïne, nous avons évalué la mémoire spatiale de travail en utilisant le test du labyrinthe en Y. Contrairement à d'autres tests de mémoire chez le rongeur, celui-ci n'implique pas de stimulus aversif (par exemple un choc électrique pour l'évitement passif (*passive avoidance* (Tayebi Meybodi et al., 2005)) ou récompensant (la nourriture dans certaines procédures de labyrinthe à 5 ou 8 bras par exemple), un facteur potentiel de confusion lorsqu'il s'agit d'évaluer les effets mnésiques d'opiacés. Nos résultats indiquent que se développe progressivement au cours de l'abstinence une perturbation de la mémoire spatiale de travail. Après une semaine d'abstinence, les animaux des groupes saline et héroïne présentent des niveaux d'alternance spontanée similaires (figure 20A). Puis, nous avons observé après 4 semaines une diminution des performances uniquement chez les animaux ayant reçu des injections d'héroïne. Pour cette durée d'abstinence, l'héroïne induit également une augmentation de l'activité locomotrice d'exploration du labyrinthe (figure 20B). Il faut noter que cette hyperactivité locomotrice n'était pas retrouvée dans le test du champ ouvert (groupes 4 semaines, figure 16A), suggérant que les activités locomotrices dans ces deux tests dépendent de processus différents : l'activité locomotrice dans le test du champ ouvert reflète en partie l'état d'anxiété des animaux, une composante probablement plus marginale dans le labyrinthe en Y. Dans les tests d'alternance spontanée, de nombreux composés sont connus pour induire, lors d'une administration systémique aigue, une diminution de performance chez les rongeurs. Parmi ces composés, on retrouve notamment la scopolamine (un antagoniste des récepteurs muscariniques à l'acétylcholine mAch), les amphétamines (un inhibiteur de la recapture des monoamines (Kuczenski et al., 1995)) ou le quinpirole (un agoniste du récepteur à la dopamine D2) (Kokkinidis and Anisman, 1976). Ces résultats indiquent que de nombreux systèmes de neurotransmission sont impliqués dans la réalisation d'une tache cognitive simple. Il est parfois suggéré que l'effet de ces drogues sur la performance d'alternance serait secondaire à leur effet hyperlocomoteur (Einat and Szechtman, 1995), un effet confondant qui pourrait être à l'œuvre dans nos conditions chez les animaux abstinents depuis 4 semaines. Néanmoins le déficit d'alternance persistait en l'absence d'hyperlocomotion après 7 semaines d'abstinence (figures 20A et 20B), suggérant une dissociation entre les effets de l'héroïne sur la mémoire spatiale de travail et l'activité locomotrice dans le labyrinthe en Y.

Un déficit d'alternance spontanée a été décrit par Talley et al dans un labyrinthe en Y suite à une injection aigue systémique de morphine (Talley et al., 1999). L'injection intracérébro-ventriculaire d'un agoniste du récepteur opioïde mu (DAMGO, (Itoh et al., 1994)) ou de peptides opioïdes (Ukai et al., 2000) produit le même effet. Pour cette souche, une diminution de performance induite par la morphine est également retrouvée dans une procédure légèrement différente du labyrinthe en Y , discontinue à 2 essais (*2 trial Y-maze*) (Ma et al., 2007). Dans cette dernière étude, un déficit mnésique était retrouvé après 3 jours de sevrage (mais pas après 1 ou 5 jours) suivant un traitement avec des doses élevées (40mg/kg pendant 3 jours), mais pas avec des doses faibles (10mg/kg) de morphine. Ces résultats suggèrent que la cinétique des effets mnésiques des opiacés pourrait dépendre de façon complexe du pattern d'activation (doses, durée) du récepteur mu. Sur le plan des mécanismes d'action, ces effets sont attribués en partie à l'inhibition de neurones cholinergiques du septum médian, projetant vers l'hippocampe et exprimant le récepteur opioïde mu. En effet, l'infusion

de morphine (labyrinthe en Y, (Ragozzino and Gold, 1995)) ou de β–endorphine (labyrinthe à 8 branches, (Bostock et al., 1988)) dans le septum médian (mais pas dans le striatum ou l'amygdale (Ragozzino and Gold, 1994)) produit des déficits dans des tâches de mémoire spatiale. Par ailleurs, les récepteurs opioïdes delta et kappa moduleraient également le système cholinergique : l'activation aigue d'un de ces récepteurs réverse partiellement le déficit d'alternance spontané induit par la scopolamine (Hiramatsu et al., 2002; Ukai et al., 1997). Au-delà de ces effets aigus de l'activation des récepteurs opioïdes, les effets de l'abstinence aux opiacés sur la mémoire spatiale ont été peu caractérisés à notre connaissance en modèle animal. La cinétique que nous avons observée dans nos conditions expérimentales au cours de l'abstinence à l'héroïne, avec un déficit apparaissant progressivement entre les 1ère et 4ème semaines, peut paraitre surprenante, notamment en considérant les données chez l'homme et en modèle animal que nous avons mentionnées. La diminution de l'alternance spontanée chez les souris abstinentes à l'héroïne pourrait dépendre d'une interaction entre systèmes opioïde et cholinergique se renforçant au cours de l'abstinence. Dans une autre hypothèse, les mécanismes neurobiologiques impliqués dans cette « incubation » pourraient être différents de ceux responsables des effets mnésiques aigus des opiacés. La cinétique du trouble cognitif observée est similaire à celle observée pour l'apparition du retrait social, ce qui pourrait indiquer que ces 2 déficits dépendent en partie d'adaptations communes. Nous reviendrons sur ces considérations dans la discussion de l'expérience 2.

Expérience 2. Traitement antidépresseur chronique au cours de l'abstinence à l'héroïne

Après avoir caractérisé la cinétique des désordres émotionnels lors de l'abstinence à l'héroïne, nous avons voulu étayer la validité prédictive de notre modèle en étudiant les effets d'un traitement antidépresseur chronique lors des 4 premières semaines d'abstinence.

a) Matériels et méthodes

Schéma expérimental

Nous avons étudié ici l'effet d'un traitement chronique *per os* par la FLX au cours des 4 premières semaines d'abstinence sur les anomalies comportementales observées dans l'expérience 1, en nous focalisant sur les tests d'interactions sociales et du labyrinthe en Y. Une semaine avant le début du traitement escaladant à l'héroïne, la nourriture commerciale est remplacée par la nourriture « contrôle » pour habituer les souris aux croquettes faites à la main. Puis, les animaux reçoivent des injections d'héroïne comme précédemment. Vingt-quatre heures après la dernière injection d'héroïne, les souris sont réparties en 2 groupes recevant une nourriture « contrôle » ou la nourriture contenant de la FLX (permettant d'administrer une dose de 10 mg/kg environ, voir les données supplémentaires de l'article 2). L'expérience a été répétée de manière indépendante sur 2 cohortes d'animaux. Au total, les 63 souris utilisées se répartissent en 4 conditions expérimentales: 1) souris ayant reçu des injections de solution saline et une nourriture « nature » (saline-nature, SN, n=15), 2) souris ayant reçu des injections de solution saline et une nourriture supplémentée en FLX (saline-FLX, SF, n=16), 3) souris abstinentes à l'héroïne ayant reçu une nourriture « nature » (héroïne-nature, HN, n=16) et 4) souris abstinentes à l'héroïne ayant reçu une nourriture supplémentée en FLX (héroïne-FLX, HF, n=16). Le traitement FLX est arrêté 48 heures avant le début des tests comportementaux.

Animaux et conditions d'hébergement

Les animaux utilisés (de souche C57BL/6J) et les conditions d'hébergement sont identiques à ceux de l'expérience 1.

Drogues

L'héroïne est préparée et administrée comme lors de l'expérience 1. La FLX (Sigma, France) est mélangée à la nourriture (R04, SAFE) en poudre, et administrée *per os* sous forme de granules formés à partir d'eau de boisson et de poudre, compactés puis lyophilisés. La dose de 10 mg/kg est calculée par rapport à la consommation moyenne de nourriture d'une souris par jour, soit environ 4 g/souris/24 h. La nourriture contrôle est fabriquée « maison » à l'identique, mais contient uniquement de la nourriture (R04) en poudre et de l'eau.

Tests comportementaux

Dans cette expérience 2, nous avons réalisé les tests comportementaux pour lesquels nous avions observé un effet de l'abstinence à l'héroïne au cours de l'expérience 1 (interactions sociales et labyrinthe en Y).

Analyse statistique

Les résultats sont exprimés et présentés sous la forme de la moyenne ± l'erreur standard. Pour la comparaison des moyennes entre groupes, une analyse de la variance (ANOVA) est utilisée, avec 2 facteurs interindividuels : le traitement (héroïne/saline) et la nourriture reçue lors de l'abstinence (nature/FLX).

b) Résultats

Interactions sociales

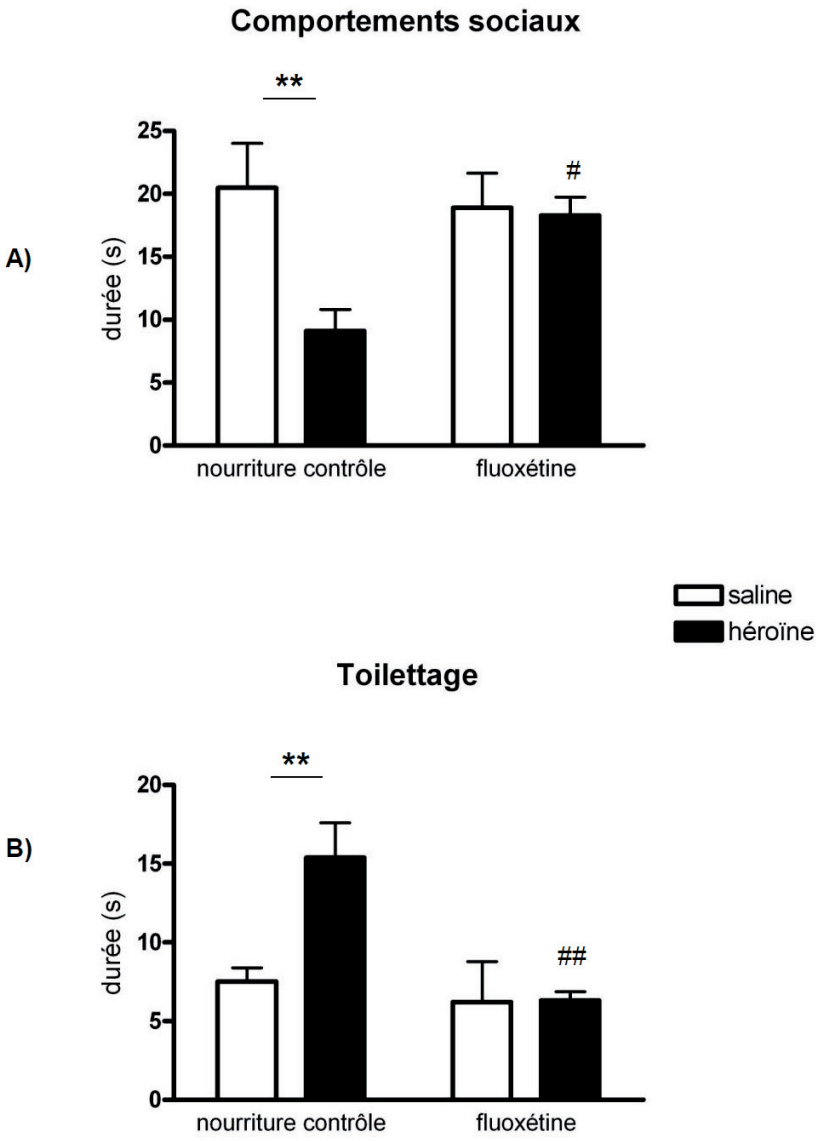


Figure 22. Mesure des effets d'un traitement antidépresseur pendant l'abstinence à l'héroïne sur les interactions sociales. Au cours des quatre semaines suivant le traitement chronique à la solution saline (barre blanche) ou à l'héroïne (barre noire) les souris (n=15 à 16/groupe) reçoivent de la nourriture supplémentée en fluoxétine (10 mg/kg) ou de la nourriture nature (contrôle). Puis des couples de souris (non familières, mais issues de la même condition expérimentale) sont testés pour leurs comportements sociaux (reniflement, poursuite et contacts physiques) (**A**).Le comportement individuel de toilettage est également mesuré (**B**). Les résultats sont présentés sous la forme de la moyenne ± l'erreur standard. ** $p<0,01$ indique un effet significatif de l'abstinence à l'héroïne, #

p<0,05, ## p<0,01 indiquent un effet significatif du traitement fluoxétine par rapport au groupe contrôle correspondant (analyses à postériori).

La figure 22 représente l'effet du traitement chronique avec la FLX au cours des 4 semaines d'abstinence suivant une exposition répétée à l'héroïne. L'analyse de la variance détecte un effet significatif de l'héroïne [F(1,27)=6,2; p=0,020], mais pas de la FLX [F(1,27)=2,5; p=0,12] sur les comportements sociaux (figure 22A). L'interaction entre ces 2 paramètres était significative [F(1,27)=4,9; p=0,035]. La comparaison des moyennes intergroupes de Fisher indique une diminution significative du temps passé à interagir au sein du groupe héroïne-nature par rapport au groupe saline-nature (p=0,003), et cette différence est reversée par le traitement avec la FLX (groupe héroïne-FLX versus groupe saline-nature, p=0,53). Le groupe héroïne-FLX passe significativement plus de temps à effectuer des comportements sociaux que le groupe héroïne-nature (p=0,011). Le traitement FLX était sans effet entre les groupes saline-nature et saline-FLX (p=0,66).

Le temps consacré à l'exécution des séquences de toilettage individuel, représenté sur la figure 22B, est affecté par le traitement héroïne [F(1,27)=4,8; p=0,038] et par la FLX [F(1,27)=8,2; p=0,0082], avec une interaction significative [F(1,27)=4,5; p=0,042]. La comparaison des moyennes entre groupes indique une augmentation de la durée de toilettage individuel du groupe héroïne par rapport au groupe saline, dans la condition nature (p=0,0057). De plus, le groupe héroïne-FLX présente une diminution du temps de toilettage par rapport au groupe héroïne-nature (p=0,0013). A nouveau la FLX était sans effet sur ce paramètre dans les groupes de souris saline (p=0,62).

Labyrinthe en Y

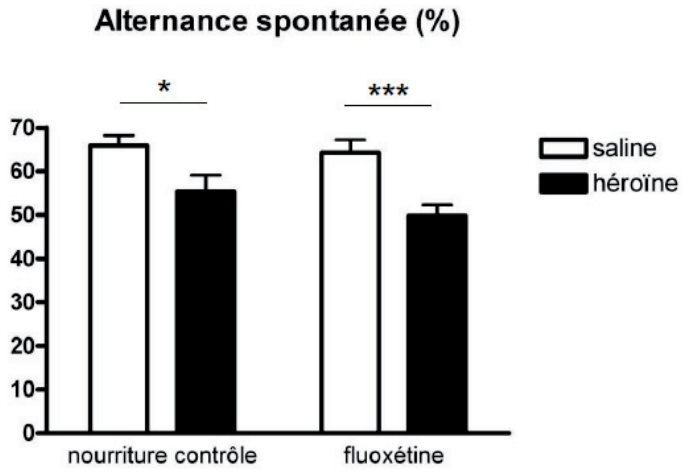


Figure 23. Mesure de la mémoire de travail spatiale dans le test du labyrinthe en Y suite à un traitement antidépresseur au cours de l'abstinence à l'héroïne. Au cours des quatre semaines suivant le traitement chronique à la solution saline (barre blanche) ou à l'héroïne (barre noire) les souris (n=15 à 16/groupe) reçoivent de la nourriture supplémentée en fluoxétine (10 mg/kg) ou de la nourriture nature (contrôle). Les souris sont placées dans un labyrinthe en Y et l'alternance spontanée dans les 3 bras (**A**) ainsi que le nombre de bras visités (**B**) sont mesurés. Les résultats sont présentés sous la forme de la moyenne ± l'erreur standard. * $p<0,05$, *** $p<0,001$ indiquent un effet significatif de l'abstinence à l'héroïne (analyses à postériori).

La figure 23 représente l'effet de l'abstinence à l'héroïne et du traitement antidépresseur dans le test du labyrinthe en Y. L'ANOVA indique un effet significatif de l'héroïne [$F(1,56)=17,7$; $p<0,001$], mais pas d'effet de l'antidépresseur [$F(1,56)=1,4$; $p=0,24$], ni d'interaction entre les 2 facteurs [$F(1,56)=0,44$; $p=0,51$].L'analyse à postériori indique que cet effet de l'abstinence est significatif chez les souris ayant reçu une nourriture supplémentée en FLX ($p<0,001$) ou une nourriture contrôle ($p=0,019$).

c) Discussion

Dans cette expérience, nous avons administré aux souris abstinentes un traitement antidépresseur chronique par la FLX. La FLX est un antidépresseur couramment utilisé en clinique ciblant spécifiquement le système sérotoninergique. Les traitements antidépresseurs sont considérés chez l'homme comme n'ayant pas d'effet sur l'humeur chez des sujets sains ne présentant pas de morbidité psychiatrique. Par analogie, la dose de FLX administrée dans cette étude a été choisie sur la base d'études préliminaires (voir données supplémentaires de l'article 2) démontrant son absence d'effet sur des animaux naïfs de souche C57BL/6J. Comme attendu, nous n'avons pas observé d'effet

du traitement antidépresseur chronique chez les souris des groupes saline (saline-nature et saline-FLX).

Par ailleurs, les résultats de cette expérience confortent ceux obtenus lors de l'expérience 1. Ainsi, nous retrouvons chez les animaux contrôles recevant une nourriture nature les mêmes effets de l'abstinence à l'héroïne que précédemment dans les tests d'interaction sociale et de labyrinthe en Y. Ces anomalies sont donc reproductibles dans nos conditions expérimentales. Ces 2 déficits, dont nous avons vu qu'ils se développent entre la 1ère et la 4ème semaine d'abstinence, sont différemment affectés par le traitement antidépresseur chronique. Comme lors de nos travaux sur la morphine (voir article 2), la FLX est capable de prévenir l'apparition du retrait social, corrigeant à la fois la diminution de la durée des interactions sociales ainsi que l'augmentation du comportement de toilettage induits par l'héroïne. Ces données documentent la validité prédictive de notre modèle de comorbidité entre dépendance aux opiacés et désordres émotionnels et cognitifs. En effet, ils démontrent qu'un traitement antidépresseur chronique sans effet sur les animaux contrôles, affecte sélectivement les réponses comportementales des animaux abstinents.

Il serait intéressant d'évaluer la capacité du traitement antidépresseur, non plus à prévenir mais à guérir les déficits comportementaux survenant lors de l'abstinence. Ainsi se pose la question de l'effet d'un traitement antidépresseur débuté après la 4ème semaine (et poursuivi jusqu'à 8 semaines d'abstinence par exemple) sur le retrait social mais aussi sur l'augmentation du comportement de résignation observés dans l'expérience 1.

A ce stade de notre étude, nous avons documenté les effets d'un traitement morphinique chronique sur le système sérotoninergique (voir les articles 2 et 3), ainsi que les effets d'un traitement antidépresseur à tropisme sérotoninergique lors de l'abstinence à la morphine et à l'héroïne. Au contraire, le traitement FLX chronique ne permet pas de prévenir la diminution de la performance des animaux abstinents à l'héroïne dans un test de mémoire spatiale. Ce résultat suggère l'implication de mécanismes non sérotoninergiques dans l'apparition du déficit mnésique. Plusieurs neurotransmetteurs (acétylcholine, glutamate, dopamine) pourraient être impliqués ici, dans diverses structures cérébrales (hippocampe, cortex frontal par exemple), comme nous l'avons déjà mentionné. Cependant, nous sommes bien conscients que l'inefficacité de la FLX sur la diminution de la performance d'alternance spontanée ne permet pas d'affirmer que ce déficit se développe indépendamment d'adaptations sérotoninergiques. Ainsi, une dose supérieure de FLX, ou un antidépresseur au spectre d'action plus large (inhibant la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline, comme les tricycliques) pourraient être plus efficaces. Bien que cela représente un travail de mise au point pour le choix d'une dose de traitement, il pourrait être utile de tester d'autres molécules aux propriétés antidépressives dans notre modèle.

Expérience 3. Rôle du récepteur opioïde kappa dans l'abstinence à l'héroïne.

Les états émotionnels négatifs associés à l'addiction impliquerait les systèmes de neurotransmission lies au stress, en particulier la dynorphine et son récepteur, le récepteur opioïde kappa (voir (Koob, 2008), l'introduction du présent manuscrit et l'article 1). L'activation du récepteur kappa par son ligand endogène ou par un agoniste exogène produit chez l'homme une dysphorie, caractérisée par une sensation de faiblesse, un état d'inquiétude, voir un effet psychotomimétique (Pfeiffer et al., 1986). De plus, de nombreuses données indiquent que l'activité de ce système dynorphine-kappa est potentialisée avec l'apparition de comportements de type addictif en modèles animaux. L'auto-administration prolongée (6 semaines) d'héroïne chez le rat entraine une augmentation de l'expression du gène de la PDYN dans le noyau accumbens et dans l'amygdale centrale (Solecki et al., 2009). Au cours de l'abstinence, ce tonus dynorphinergique majoré se maintiendrait, notamment dans l'amygdale et l'hippocampe (Rattan et al., 1992).

Le récepteur opioïde kappa joue un rôle majeur dans les réponses au stress et serait impliqué dans les pathologies associées au stress, notamment la dépression (Nestler and Carlezon, 2006). Le blocage pharmacologique du récepteur kappa, ou la délétion génétique du récepteur kappa ou de la PDYN atténuent l'expression de comportements de type dépressif chez la souris, ainsi que certaines réponses au stress (comme la rechute dans des modèles d'addiction) (Bruchas and Chavkin, 2010). Les souris dépourvues du gène de la prodynorphine ou traitées avec un antagoniste du récepteur kappa montrent une sensibilité diminuée au CSD (voir introduction), un modèle établi de dépression chez le rongeur (McLaughlin et al., 2006).

L'ensemble de ces données suggère donc que la potentialisation de l'activité du système dynorphine-kappa pourrait contribuer à l'émergence d'états émotionnels négatifs au cours d'un sevrage opiacé prolongé. Dans cette expérience 5, nous avons exploré le rôle du récepteur opioïde kappa dans l'abstinence à l'héroïne en utilisant les souris KO pour le récepteur kappa disponibles au laboratoire.

a) Matériels et méthodes

Schéma expérimental

Nous avons étudié les effets comportementaux de l'abstinence à l'héroïne chez des souris sauvages (wild-type, WT) ou KO pour le récepteur kappa. Nous nous sommes concentrés sur une durée d'abstinence de 4 semaines, et sur les tests d'interaction sociale et de préférence pour le sucrose, c'est-à-dire respectivement le test (interactions sociales) pour lequel le phénotype est le plus robuste dans l'ensemble de nos résultats (morphine et héroïne confondues) et celui pour lequel (préférence pour le sucrose) les animaux KO pour les récepteurs delta ou kappa n'ont pas été encore caractérisés. L'expérience a été répétée de manière indépendante sur 2 cohortes d'animaux. Les 70

souris sont réparties en 4 conditions expérimentales : 1) souris WT ayant reçu des injections de solution saline (kappa WT saline, n=17), 2) souris WT abstinentes à l'héroïne (kappa WT héroïne, n=17), 3) souris KO pour le récepteur kappa ayant reçu des injections de solution saline (kappa KO saline, n=17) et 4) souris KO pour le récepteur kappa abstinentes à l'héroïne (kappa KO héroïne, n=19).

Animaux et conditions d'hébergement

Les conditions d'hébergement sont identiques à celles de l'expérience 1. Les souris utilisées sont des animaux génétiquement modifiés KO pour le récepteur kappa. Les animaux mutants ont été préalablement générés au laboratoire sur un fond génétique hybride 129SvPas (50%)-C57BL/6J (50%). La mutation a été obtenue par recombinaison homologue en remplaçant le codon d'initiation et le premier exon du gène du récepteur kappa par une « cassette » de résistance à la néomycine (Simonin et al., 1998). Les animaux d'expérience WT et KO sont obtenus par croisement de parents hétérozygotes WT ou KO. Ces animaux sont élevés à la clinique de la souris, et transférés dans la zone de phénotypage 2 semaines avant le début de l'expérience.

Tests comportementaux

Les tests comportementaux sont réalisés comme indiqués dans l'expérience 1, excepté pour le test d'interaction sociale. Etant donné les contraintes inhérentes à la génération de cohortes de souris génétiquement modifiés mâles âgées de 8 à 10 au début des injections, nous avons utilisé une procédure d'interactions sociales légèrement modifiée. Des travaux menés récemment au laboratoire (Le Merrer et Becker, données non publiées) ont montré que le phénotype de retrait social est également observé lorsque les animaux abstinents aux opiacés sont mis en situation d'interaction sociale avec une souris naïve et non plus avec une souris du même groupe expérimental. Ainsi, dans cette expérience, chacun des animaux ayant reçu des injections de solution saline ou d'héroïne (animal testé) interagit avec un congénère naïf non familier (interacteur). On mesure alors uniquement les comportements sociaux des animaux testés, comme décrit précédemment.

Analyse statistique

Les résultats sont exprimés et présentés sous la forme de la moyenne ± l'erreur standard. Pour la comparaison des moyennes entre groupes, une analyse de la variance (ANOVA) est utilisée, avec 2 facteurs interindividuels : le traitement (héroïne/saline) et le génotype des animaux (WT/KO).

b) Résultats

Interactions sociales

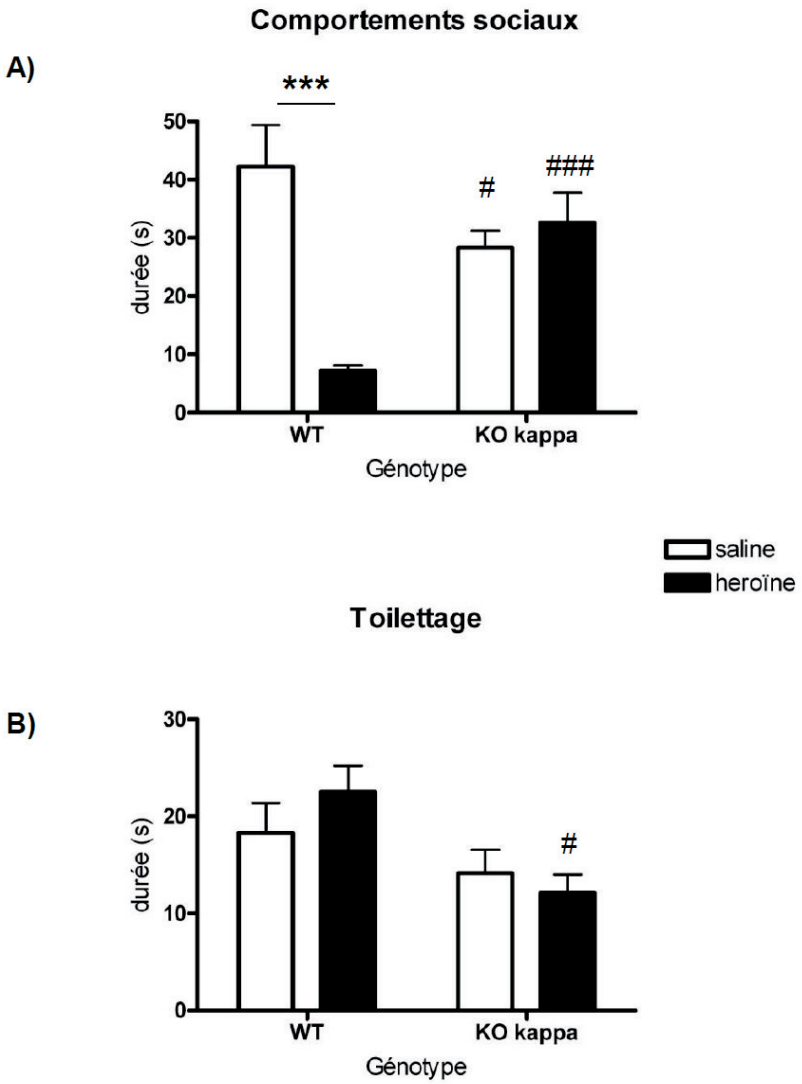


Figure 24. Mesure des effets de la délétion génétique du récepteur kappa sur les interactions sociales lors de l'abstinence à l'héroïne. Quatre semaines après le traitement chronique à la solution saline (barres blanches) ou à l'héroïne (barres noires), les animaux KO pour le récepteur kappa (KO kappa) ou contrôles (WT) sont testés individuellement pour leur comportement social (reniflement, poursuite et contacts physiques) avec une souris non familière, interacteur naïf (**A**). Le comportement individuel de toilettage est également mesuré (**B**). Les résultats sont présentés sous la forme de la moyenne ± l'erreur standard (n=17-19/condition expérimentale). *** $p<0,001$ indique un effet significatif de l'abstinence à l'héroïne, # $p<0,05$, ### $p<0,001$ indiquent un effet significatif du génotype (analyses à postériori).

Dans le test d'interactions sociales, l'analyse statistique retrouve un effet significatif du traitement héroïne sur la durée des comportements sociaux [F(1;65)=11,0; p=0,0015] (figure 24A), ainsi qu'une interaction entre ce traitement et le génotype des animaux [F(1;65)=18,1; p<0,001]. Ce dernier facteur considéré isolément était sans effet [F(1;65)=1,6; p=0,21]. L'analyse à postériori montre que les souris héroïne WT interagissent nettement moins avec le congénère non familier que les souris saline WT (p<0,001). Au contraire, chez les souris héroïne KO kappa, l'abstinence ne produisait pas cet effet de retrait social (par rapport au groupe saline KO kappa, p=0,50), et les interactions sociales étaient augmentées par rapport au groupe héroïne WT (p<0,001). Enfin, les souris saline WT interagissaient plus que les souris saline KO kappa (p=0,0416).

L'analyse de la variance du comportement de toilettage (figure 24B) indique une réduction significative chez les animaux KO kappa [F(1;65)=8,4; p=0,005]. Par contre, le traitement héroïne était sans effet [F(1;65)=0,20; p=0,66] et il n'y avait pas d'interaction [F(1;65)=1,6; p=0,21]. L'analyse à postériori montre que cette diminution du toilettage était significative chez les souris des groupes héroïne (p=0,0037), mais pas chez les souris des groupes saline (p=0,26).

Préférence pour le sucrose

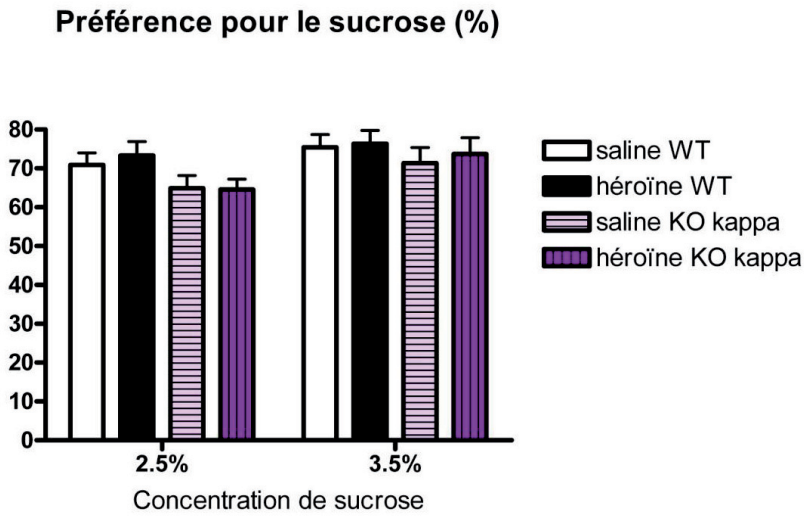


Figure 25. Mesure des effets de la délétion génétique du récepteur kappa sur la préférence pour le sucrose lors de l'abstinence à l'héroïne. Quatre semaines après le traitement chronique à la solution saline ou à l'héroïne la préférence pour le sucrose est évaluée individuellement chez les animaux KO pour le récepteur kappa (KO kappa, violet) ou contrôles (WT, noir et blanc). Les résultats sont présentés sous la forme de la moyenne ± l'erreur standard (n=17-19/condition expérimentale).

Le pourcentage de préférence (figure 25) pour une solution sucrée n'était modifiée ni par l'abstinence à l'héroïne [F(1;65)=0,16; p=0,69], ni par le génotype [F(1;65)=2,7; p=0,10]. L'analyse statistique ne retrouvait pas non plus d'interaction entre ces 2 facteurs [F(1;65)=0,10; p=0,92].

c) Discussion

Nous avons étudié le rôle du récepteur kappa dans l'apparition de troubles émotionnels lors de l'abstinence. Les souris KO kappa ne montre classiquement pas de modification des réponses émotionnelles en conditions basales, dans des tests explorant les comportements de type anxieux et dépressif (Filliol et al., 2000). De même, nos résultats indiquent que cette mutation génétique constitutive ne modifie pas l'état hédonique des animaux exploré par le test de la préférence pour le sucrose. Cependant, la mutation semble avoir un effet sur le comportement social des souris. Nous avons observé en conditions basales (groupe saline KO kappa par rapport au groupe saline WT) une diminution modeste des comportements sociaux chez les animaux KO, alors que la durée de toilettage n'était pas modifiée. Nous n'avons pas connaissance d'une caractérisation des interactions sociales chez ces souris KO kappa dans la littérature. Ce résultat suggère que la signalisation kappa est impliquée dans l'expression physiologique du comportement exploratoire d'un congénère non familier.

Comme lors de nos autres expériences sur l'abstinence à l'héroïne, nous avons retrouvé chez les animaux WT kappa un retrait social après 4 semaines d'abstinence. Néanmoins, ce retrait social s'accompagne généralement d'une augmentation du comportement de toilettage, chez des souris commerciales de fond génétique pur C57BL/6J (expériences 1 et 2) et chez des souris de fond génétique hybride 129SvPas (50%)-C57BL/6J (50%) (voir expérience 4). Pourtant, chez les animaux contrôles de la présente expérience, nous ne retrouvons pas cette augmentation de la durée de toilettage, suggérant que chez les souris de fond génétique hybride, cette composante du phénotype abstinent est inconstante. De façon alternative, les lignées de souris permettant la production d'animaux KO delta et KO kappa (et de leur contrôles WT), bien que théoriquement identiques, pourraient avoir présenté des dérives génétiques différentes interférant avec les effets de l'abstinence.

De façon spectaculaire, le retrait social induit par l'abstinence à l'héroïne était totalement aboli chez les animaux KO kappa. Il peut paraître contradictoire que la diminution des interactions sociales en conditions basales chez les souris KO kappa (saline WT versus saline KO kappa) s'accompagne d'une résistance à l'émergence d'un retrait social lors de l'abstinence (saline KO kappa versus héroïne KO kappa). Nous proposons que le tonus opioïde physiologique ciblant le récepteur kappa participe à l'expression des comportements sociaux en situation physiologique. En situation pathologique (l'abstinence aux opiacés par exemple), l'augmentation de ce tonus aurait au contraire des effets délétère sur les comportements sociaux. Il est intéressant de constater que le récepteur mu pourrait présenter le même profil bi-phasique dans la régulation de ces comportements (voir notre revue de la littérature dans l'article 1).

Quelques données récentes pointent vers l'implication du récepteur opioïde kappa dans la régulation des comportements sociaux. Par exemple, ce récepteur est impliqué dans l'apparition de postures de soumission suite au stress de mise en échec social répété pendant 3 jours (McLaughlin et al., 2006). Le stress social comme les stress environnementaux mettent en jeu le neuromodulateur CRF. L'administration systémique de CRF induit chez la souris une activation du système dynorphine-kappa, révélée par la phosphorylation du récepteur dans plusieurs structures cérébrales (Land et al.,

2008) : principalement le noyau du raphé dorsal, l'amygdale baso-latérale et l'hippocampe. Un travail récemment publié indique également que le récepteur kappa régule un comportement particulier chez le campagnol des prairies (Resendez et al., 2012). Ce rongeur établit des relations monogames : la formation et la stabilisation d'un couple nécessite l'expression d'un comportement de rejet agressif des congénères non familiers. Ce rejet des congénères peut être bloqué par l'administration de nor-BNI, l'antagoniste spécifique de référence du récepteur kappa, par voie systémique ou localement dans la région « coque » (*shell*) du noyau accumbens. Ainsi, l'activation du récepteur kappa pourrait sous-tendre les réactions d'aversion aux stimuli sociaux. Nous faisons l'hypothèse qu'une potentialisation du système dynorphine-kappa serait impliquée dans l'apparition du retrait social chez les animaux abstinents à l'héroïne. Dans cette hypothèse, ce retrait traduirait une aversion plutôt qu'une indifférence pour l'exploration d'un congénère non familier (voir la discussion de l'expérience 1). Cette potentialisation du système dynorphine-kappa se produirait au cours du traitement héroïne escaladant, sous l'effet de l'activation intermittente du récepteur mu, et persisterait pendant la période d'abstinence (voir l'introduction de la présente expérience). Chez les animaux KO kappa, l'augmentation de la libération de dynorphine serait sans effet, et le retrait social ne se manifesterait pas. Il serait intéressant d'étudier les effets du KO du récepteur kappa sur l'apparition d'un comportement de résignation après 7 semaines d'abstinence à l'héroïne.

Expérience 4. Rôle du récepteur opioïde delta dans l'abstinence à l'héroïne.

Un traitement chronique par la morphine, bien que ciblant le récepteur mu, semble induire une potentialisation de l'activité du récepteur delta, par exemple dans l'amygdale (Chieng and Christie, 2009) et dans la substance grise périacqueducale (PAG; (Hack et al., 2005)), une région impliquée dans la régulation émotionnelle (Graeff, 2004). La persistance à long terme et les conséquences émotionnelles de ce type d'effet sont peu connues, mais pourraient intervenir dans notre modèle suite au traitement héroïne escaladant.

Le récepteur opioïde delta est fortement exprimé dans les structures limbiques (hippocampe, amygdale, noyau accumbens) qui jouent un rôle important dans le contrôle émotionnel (Goody et al., 2002). Les souris invalidées pour le gène codant pour ce récepteur (souris KO pour le récepteur delta, KO delta) présentent une augmentation de comportements apparentés à l'anxiété et à la dépression (Filliol et al., 2000), désignant les souris KO delta comme un mutant vulnérable sur le plan émotionnel. En accord avec ces données génétiques, les agonistes spécifiques de ce récepteur (SNC80, BW373U86, ADL 5859, KNT-127) induisent des effets de type antidépresseur et anxiolytique (voir l'article 1 et (Jutkiewicz, 2006)).

Ces données suggèrent donc l'implication du récepteur delta dans l'apparition de désordres émotionnels lors d'une période d'abstinence aux opiacés. Nous avons exploré cette hypothèse dans notre modèle d'abstinence à l'héroïne en utilisant des souris KO delta.

a) Matériels et méthodes

Schéma expérimental

Nous avons étudié les effets comportementaux de l'abstinence à l'héroïne chez des souris WT ou KO pour le récepteur delta de fond génétique hybride 129SvPas (50%)-C57BL/6J (50%). Les tests comportementaux réalisés sont identiques à ceux de l'expérience 3. L'expérience a été répétée de manière indépendante sur 2 cohortes d'animaux. Les 58 souris sont réparties en 4 conditions expérimentales : 1) souris WT ayant reçu des injections de solution saline (delta WT saline, n=14), 2) souris WT abstinentes à l'héroïne (delta WT héroïne, n=15), 3) souris KO pour le récepteur delta ayant reçu des injections de solution saline (delta KO saline, n=15) et 4) souris KO pour le récepteur delta abstinentes à l'héroïne (delta KO héroïne, n=14).

Animaux et conditions d'hébergement

Les conditions d'hébergement sont identiques à celles de l'expérience 1. Les souris utilisées sont des animaux génétiquement modifiés KO pour le récepteur delta. Les animaux mutants ont été préalablement générés au laboratoire sur un fond génétique hybride 129SvPas (50%)-C57BL/6J

(50%). Brièvement, la mutation a été obtenue par recombinaison homologue en remplaçant le codon d'initiation et le premier exon du gène du récepteur delta par une « cassette » de résistance à la néomycine (Filliol et al., 2000). Les animaux WT et KO sont obtenus par croisement de parents hétérozygotes WT ou KO. Ces animaux sont élevés à la clinique de la souris, et transférés dans la zone de phénotypage 2 semaines avant le début de l'expérience.

Tests comportementaux

Les tests comportementaux sont réalisés comme indiqués dans l'expérience 3.

Analyse statistique

Les résultats sont exprimés et présentés sous la forme de la moyenne ± l'erreur standard. Pour la comparaison des moyennes entre groupes, une analyse de la variance (ANOVA) est utilisée, avec 2 facteurs interindividuels : le traitement (héroïne/saline) et le génotype des animaux (WT/KO).

b) Résultats

Interactions sociales

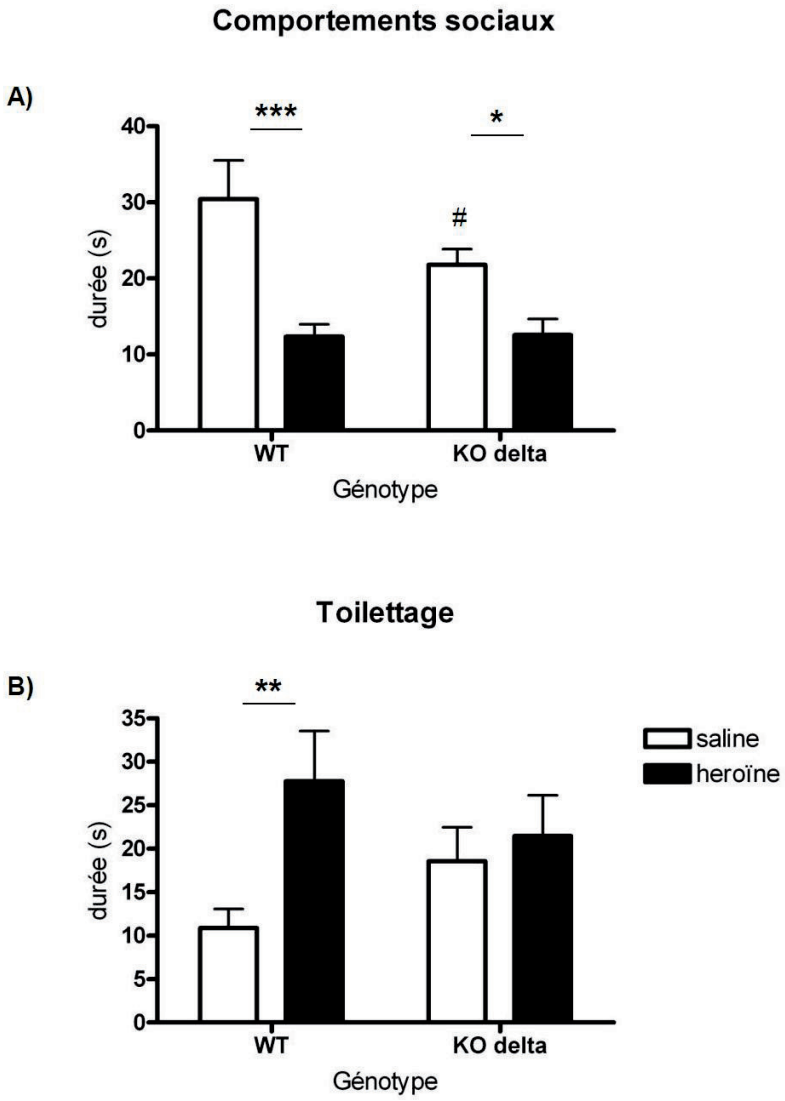


Figure 26. Mesure des effets de la délétion génétique du récepteur delta sur les interactions sociales lors de l'abstinence à l'héroïne. Quatre semaines après le traitement chronique à la solution saline (barres blanches) ou à l'héroïne (barres noires), les animaux KO pour le récepteur delta (KO delta) ou contrôles (WT) sont testés individuellement pour leur comportement social (reniflement, poursuite et contacts physiques) avec une souris non familière, interacteur naïf (**A**). Le comportement individuel de toilettage est également mesuré (**B**). Les résultats sont présentés sous la forme de la moyenne ± l'erreur standard (n=14-15/condition expérimentale). * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ indiquent un effet significatif de l'abstinence à l'héroïne, # $p<0,05$ indique un effet significatif du génotype (analyses à postériori).

La figure 26 représente l'effet de 4 semaines d'abstinence à l'héroïne chez des animaux WT ou KO delta dans le test d'interactions sociales. Similaire aux résultats obtenus dans les expériences 1 et 2, la durée des **comportements sociaux** (figure 26A) était significativement diminuée lors de l'abstinence à l'héroïne [$F(1;54)=20,8$; $p<0,001$]. Le génotype des animaux était sans effet sur ce paramètre [$F(1;54)=2,0$; $p=0,17$] et il n'y avait pas d'interaction entre les 2 facteurs [$F(1;54)=2,2$; $p=0,15$]. L'analyse à postériori montre que l'effet de l'héroïne est significatif chez les groupes de souris WT ($p<0,001$) et chez les souris KO delta ($p=0,033$). Bien que l'interaction entre génotype et traitement héroïne ne soit pas significative, notons que l'analyse à postériori retrouve une diminution des comportements sociaux chez les souris saline KO delta par rapport aux contrôles saline WT ($p=0,046$).

La durée du comportement de **toilettage** (figure 26B) est également significativement modifiée par l'abstinence à l'héroïne [$F(1;54)=5,1$; $p=0,029$]. Comme pour la durée des comportements sociaux, le paramètre du toilettage n'est pas modifiée par le génotype des animaux [$F(1;54)=0,24$; $p=0,88$], et il n'y avait pas d'interaction entre génotype et traitement héroïne [$F(1;54)=2,5$; $p=0,12$]. Bien que l'analyse statistique ne retrouve pas d'interaction significative entre traitement et génotype, l'augmentation du toilettage induite par l'héroïne semble se produire essentiellement chez les souris WT. L'analyse à postériori ne retrouve une modification significative de la durée de toilettage que chez les souris des groupes WT ($p=0,009$), mais pas chez les souris du groupe KO ($p=0,64$). Enfin, il n'y avait pas de modification de ce paramètre entre les souris saline WT et saline KO ($p=0,22$).

Préférence pour le sucrose

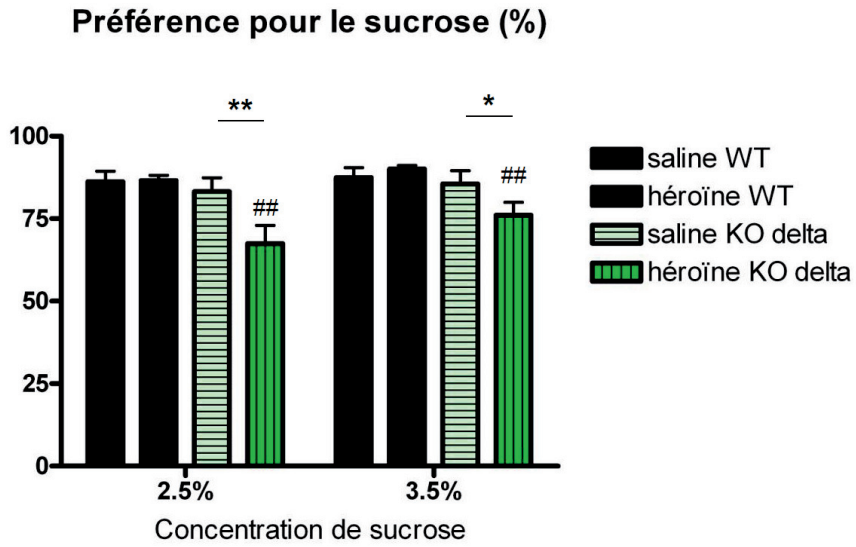


Figure 27. Mesure des effets de la délétion génétique du récepteur delta sur la préférence pour le sucrose lors de l'abstinence à l'héroïne. Quatre semaines après le traitement chronique à la solution saline ou à l'héroïne la préférence pour le sucrose est évaluée individuellement chez les animaux KO pour le récepteur delta (KO delta, vert) ou contrôles (WT, noir et blanc). Les résultats sont présentés sous la forme de la moyenne ± l'erreur standard (n=14-15/condition expérimentale). * p<0,05, ** p<0,01, indiquent un effet significatif de l'abstinence à l'héroïne, ## p<0,01 indique un effet significatif du génotype (analyses à postériori).

Pour le test de la préférence pour le sucrose (figure 27), l'analyse de la variance révèle un effet significatif du génotype [F(1;55)=8,45; p=0,0052], ainsi qu'une interaction significative entre génotype et traitement [F(1;55)=4,6; p=0,036]. L'héroïne séparément n'affectait pas significativement la préférence pour le sucrose [F(1;55)=2,9; p=0,094]. L'analyse à postériori confirme cette interaction. Ainsi, la préférence pour une solution sucrée à 2,5% est bien diminuée par l'abstinence à l'héroïne chez les souris KO delta (saline KO delta versus héroïne KO delta, p=0,006) mais pas chez les souris WT (p=0,95). De plus, la préférence est diminuée chez les souris abstinentes à l'héroïne par la mutation (héroïne WT versus héroïne KO delta, p=0,001), un effet non retrouvé chez les souris des groupes contrôles (saline WT versus saline KO delta, p=0,60).

Pour la concentration de sucrose supérieure (3,5%), on observe un résultat similaire, avec une anhédonie induite par l'héroïne chez les souris KO (p=0,042) mais pas chez les souris WT (p=0,58). De plus, la préférence était diminuée chez les souris abstinentes à l'héroïne par la mutation (héroïne WT versus héroïne KO delta, p=0,0033), un effet non retrouvé chez les souris des groupes contrôles (saline WT versus saline KO delta, p=0,68).

c) Discussion

A notre connaissance, le tonus hédonique et les comportements sociaux n'ont pas encore été évalués chez les souris KO delta. Dans cette expérience, nous avons mesuré une légère diminution de la durée des interactions sociales avec un nouveau congénère chez ces animaux. Cet effet pourrait être du aux niveaux augmentés des comportements de type anxieux et dépressif classiquement décrits chez les souris KO delta (Filliol et al., 2000). Ces modifications des conduites émotionnelles ne s'accompagnent d'aucun effet sur le tonus hédonique, les souris KO delta présentant en conditions basales (saline WT versus saline KO delta) une préférence pour le sucrose non modifiée.

Dans cette expérience, nous mettons en évidence un rôle du récepteur delta lors de l'abstinence à l'héroïne. Dans le test d'interactions sociales, nous retrouvons à la fois chez les animaux WT et chez les animaux delta KO une diminution nette de la durée des comportements sociaux. Ce résultat obtenu sur un fond génétique hybride, 129SvPas (50%)-C57BL/6J (50%), vient conforter nos résultats précédents chez des souris commerciales de souche C57BL/6J pure (voir expériences 1 et 2), indiquant que cet effet de l'abstinence à l'héroïne est robuste. De plus, nous montrons ici que les souris delta KO développent après une abstinence à l'héroïne prolongée un phénotype anhédonique. Nous n'avons pas retrouvé d'anhédonie chez les souris WT abstinentes à l'héroïne, démontrant que les souris KO delta développent au cours de l'abstinence un phénotype aggravé, se révélant dans ces 2 modalités comportementales distinctes. Nos résultats suggèrent donc que le tonus opioïde endogène ciblant le récepteur delta aurait un effet protecteur sur la régulation de l'humeur au cours de l'abstinence. Ce résultat est cohérent avec :

- les données de la littérature que nous avons déjà mentionnées sur la potentialisation de la signalisation du récepteur delta suite à une exposition chronique à des opiacés ciblant le récepteur mu,

- les nombreuses données ayant déjà documenté l'effet de l'activation pharmacologique du récepteur delta qui produit chez des animaux naïfs un effet de type antidépresseur, notamment via des récepteurs delta exprimés dans l'amygdale (Narita et al., 2006a; Randall-Thompson et al., 2010).

Ainsi, la potentialisation de l'activité du récepteur delta suite au traitement opiacé chronique viendrait diminuer, chez les animaux WT, les conséquences émotionnelles négatives de l'abstinence. Chez les animaux mutants, en l'absence du récepteur delta, le tonus endogène ciblant ce récepteur serait inefficace et le phénotype dépressif plus important, comme indiqué par le test de la préférence pour le sucrose. A fin d'étayer notre hypothèse, nous suggérons de réaliser une étude de l'activité du récepteur delta suite au traitement héroïne escaladant et lors de l'abstinence, par exemple en utilisant la technique du [^{35}S]-GTPγS pour mesurer l'activité du récepteur delta dans l'hippocampe, le noyau accumbens ou l'amygdale basolatérale, 3 régions où le récepteur est fortement exprimé et pourrait réguler les conduites émotionnelles.

Des essais cliniques utilisant des agonistes du récepteur delta sont en cours pour le traitement de la dépression. Notre résultat indique que ces agonistes, outre leur indication dans la

dépression, pourrait également être utile dans la prise en charge de la comorbidité addiction-dépression.

Par ailleurs, le récepteur delta semble dans nos conditions impliqué sélectivement dans les effets de l'abstinence à l'héroïne sur le tonus hédonique (test de la préférence pour le sucrose), mais pas dans les effets de l'abstinence sur les comportements sociaux. Les comportements sociaux et les comportements dépressifs dépendent vraisemblablement de circuits neuronaux différents, qui interagissent et s'imbriquent de façon complexe (Meyer-Lindenberg and Tost, 2012). Alors que de nombreuses données indiquent le rôle central joué par le récepteur opioïde mu dans la régulation des comportements sociaux au cours de l'ontogénèse et tout au long de la vie (voir notre revue de la littérature, article 1), il est frappant de constater qu'il n'existe pas à notre connaissance de données sur l'impact de la signalisation du récepteur delta sur ces comportements.

Enfin, il a été montré récemment que le récepteur delta interviendrait dans le mode d'action des antidépresseurs dans leur indication pour le traitement des douleurs neuropathiques (Benbouzid et al., 2008). Ces douleurs s'associent souvent à des troubles anxieux ou dépressifs et les antidépresseurs agiraient via le récepteur opioïde delta (mais pas via le récepteur mu, (Bohren et al., 2010)), à la fois sur la douleur neuropathique (Benbouzid et al., 2008) et sur la symptomatologie dépressive associée (Narita et al., 2006a; Narita et al., 2006b). Nous faisons l'hypothèse que le récepteur delta pourrait également être impliqué dans le mécanisme d'action des antidépresseurs lorsqu'ils sont utilisés dans le traitement des désordres affectifs. Nous proposons de tester cette hypothèse séduisante dans notre modèle murin de comorbidité, en observant l'effet d'un traitement antidépresseur chronique sur les effets comportementaux de l'abstinence à l'héroïne, chez des souris WT et chez des souris KO delta.

Expérience 5. Rôle du récepteur opioïde mu dans l'abstinence à l'héroïne : approche par knockout conditionnel.

Les opiacés produisent leurs effets euphorisants en activant le récepteur mu. Un traitement chronique par la morphine ou l'héroïne, chez le rat ou la souris, induit une désensibilisation du récepteur mu dans de très nombreuses régions cérébrales (Sim-Selley et al., 2000; Sim-Selley et al., 2007). La persistance à long terme de ces adaptations n'est actuellement pas connue mais elles pourraient induire une modification de la régulation émotionnelle.

Cette partie de mon travail de thèse consiste à démontrer l'implication du récepteur mu dans notre modèle d'abstinence. En particulier, nous avons discuté dans notre introduction le contrôle majeur exercé par le récepteur mu dans le DRN sur le système sérotoninergique. Considérant l'ensemble de nos résultats qui suggèrent un rôle essentiel du DRN dans notre modèle, nous avons choisi une approche de knockout conditionnel (cKO) du gène du récepteur mu spécifiquement dans cette structure. Nous avons utilisé une stratégie dite Cre-Lox. Notre laboratoire a crée des souris génétiquement modifiées possédant 2 sites de reconnaissance de 34 paires de base appelés LoxP situés de part et d'autre des exons 2 et 3 du gène du récepteur mu (souris « floxées »). Cette modification génétique n'altère pas l'expression du gène du récepteur mu (résultats non publiés). Nous injectons ensuite par chirurgie stéréotaxique dans le DRN de ces souris mutantes des virus recombinants de sérotype AAV_2 exprimant l'enzyme Cre-recombinase. Cette enzyme est responsable d'une recombinaison ciblant les sites LoxP, permettant d'induire une excision irréversible de l'ADN située entre les deux sites LoxP. Cette propriété de l'enzyme est utilisée pour générer l'invalidation conditionnelle du gène du récepteur mu *in vivo*, dans le DRN. Dans une première étape, nous avons montré que cette approche permet d'obtenir une forte diminution de l'expression du récepteur mu dans la région d'intérêt (et pas dans la substance grise périaqueducale, une région proche exprimant également le récepteur mu). Ce résultat est présenté dans ce manuscrit. Dans une deuxième étape, nous caractérisons actuellement le comportement des souris abstinentes à l'héroïne chez qui le récepteur mu a été ainsi supprimé spécifiquement dans le DRN. Nous faisons l'hypothèse que les déficits comportementaux seront diminués voire absents chez ces animaux, révélant ainsi le rôle causal des récepteurs mu du DRN dans notre modèle de comorbidité.

a) Matériel et méthodes

Schéma expérimental

Nous disposons au laboratoire des outils nécessaires pour 2 stratégies de knockout conditionnel du récepteur mu:

- une stratégie dite « Cre-Lox » de knockout conditionnel (Gaveriaux-Ruff and Kieffer, 2007), consistant à injecter un vecteur viral exprimant l'enzyme Cre-recombinase chez des souris mu floxées,

- une stratégie de *knockdown* (KD), par injection d'un vecteur viral exprimant un *small hairpin RNA* (shRNA) ciblant spécifiquement l'ARN messager du récepteur mu.

Des expériences préliminaires conduites au laboratoire (Gardon et al, données non publiées) ont montré la faisabilité du KD du récepteur mu par injection d'un virus exprimant un shRNA ciblant ce récepteur. Les résultats obtenus suggèrent que 4 semaines après l'injection du shRNA, le niveau d'expression du récepteur est très fortement diminué. Néanmoins cette approche présente une difficulté liée à la spécificité des shRNA. En effet, certains auteurs jugent nécessaire d'utiliser 2 constructions shRNA composées de séquences nucléotidiques différentes ciblant l'ARN messager du gène d'intérêt, afin d'affirmer son implication dans l'effet biologique considéré. Nous avons donc décidé de privilégier la technologie Cre-Lox, et sacrifié les animaux 4 semaines après les injections d'AAV_2-Cre.

Les animaux (âgés de 8 à 12 semaines, pesant de 22 à 30 grammes) se répartissent en 2 groupes : 1) souris recevant des injections du vecteur viral exprimant la protéine fluorescente eGFP (GFP) et la Cre-recombinase (n=14), 2) souris contrôles recevant des injections du vecteur viral exprimant uniquement la GFP (n=16).

Animaux et conditions d'hébergement

Le laboratoire a généré des souris mutantes par insertion de 2 sites LoxP situés de part et d'autres des exons 2 et 3 du gène du récepteur mu (souris mu « floxées »), sur un fond génétique hybride 129SvPas (50%)- C57BL/6J (50%) (Gavériaux-Ruff, manuscrit en préparation). Les conditions d'hébergement sont identiques à celles des expériences 1 à 4.

Drogues

La kétamine et la xylazine sont dissoutes dans une solution saline isotonique (NaCl 0,9%). Le DAMGO (Sigma Aldrich, France), l'agoniste de référence du récepteur mu, est dissous dans de l'eau déminéralisée.

Production des vecteurs viraux recombinants

Nous avons utilisé des vecteur viraux recombinants (AAV recombinants de sérotype 2, AAV_2) exprimant soit la GFP, soit la GFP et la Cre-recombinase. Ces vecteurs sont produits de la même façon que les vecteurs viraux exprimant les shRNA précédemment utilisés au laboratoire (Darcq et al., 2011; Darcq et al., 2012). Brièvement, la production des virus est réalisée avec le système AAV2-Helper-Free system (Stratagene). Les vecteurs viraux sont générés par triple transfection d'une lignée cellulaire AAV-293 (Stratagene). Les cellules sont transfectées avec (i) pAAV-Cre-GFP codant pour la Cre-recombinase en fusion avec la GFP, (ii) pAAV-RC codant pour les protéines d'encapsidation et de réplication virales de l'AAV de serotype 2 et (iii) avec le plasmide pHelper codant pour les fonctions helper de l'adénovirus. Après deux jours, les cellules sont lysées par une succession de bains d'alcool refroidi en carboglace et de bains à 37°C, puis traitées par la Benzonase (50U/mL, Sigma) 30 minutes à 37°C et clarifiées par centrifugation. Les vecteurs viraux sont alors purifiés au travers d'un gradient d'Iodixanol par ultracentrifugation suivi d'une dialyse. Les particules virales sont quantifiées par qPCR

à l'aide d'un plasmide standard. Nous avons utilisé un titre d'environ 3.10^{12} particules virales par millilitre (viral genomes per ml, vg/ml). Les virus sont conservés à l'abri de la lumière à -80 °C.

Injection par stéréotaxie dans le DRN

Les animaux sont anesthésiés (kétamine/xylazine, 100/10 mg/kg, voie i.p.) et positionnés sur un appareil de stéréotaxie. La peau du crâne est désinfectée puis incisée longitudinalement afin de mettre l'os du crâne à nu. La surface de l'os est nettoyée et asséchée afin de rendre les structures évidentes. Après repérage des coordonnées d'injection (par rapport au lambda ; latéro-médial +0,0 mm ; antéro-postérieur -0,3 mm ; dorso-ventral +3,55 mm), la trépanation est réalisée à l'aide d'une fraise motorisée. Pour cibler la majeure partie du DRN (voir figure 28), 1,5 µl de vecteur viral recombinant sont administrés à la souris. La vitesse d'injection est de 0,1µl/min, et l'aiguille d'injection est retirée doucement 10 min après l'injection afin de minimiser le dommage des tissus et favoriser la diffusion des particules virales. La peau du crâne est recousue et les souris sont placées en période post-opératoire en cage individuelle pour 48h. Les animaux sont alors déclassés et hébergés en animalerie de type A1 pour la suite des expériences.

[^{35}S]-GTPγS sur homogénat de tissu

Quatre semaines après l'injection des virus recombinants, les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale. Le cerveau est extrait et placé dans une matrice métallique à sillons coronaux espacés de 1 mm, refroidie sur glace (Harvard Apparatus, USA). Douze lames de rasoir également refroidies sont insérées dans les sillons. La première lame est placée à la limite ventrocaudale des bulbes olfactifs. Les régions d'intérêts sont repérées par comparaison avec l'atlas stéréotaxique du cerveau de souris (Paxinos and Franklin, 1997), et des micro-prélèvements du DRN, de la substance grise périaqueducale (PAG), du MRN (prélèvements unique et médian), ainsi que du noyau accumbens (prélèvements bilatéraux) sont réalisés à l'aide d'un poinçon de 1 mm de diamètre et conservés à -80°C. On prélève le MRN sur la même tranche de cerveau que le DRN et en position ventrale par rapport à cette structure. La substance grise périaqueducale est prélevée sur la tranche de cerveau situé immédiatement en avant de celle du DRN.

Nous avons utilisé la technique de liaison de [^{35}S]-GTPγS (pour revue, voir (Sovago et al., 2001)) stimulée par un agoniste. Cette technique utilise un analogue radio-marqué [^{35}S] et non hydrolysable du GTP, le [^{35}S]-GTPγS. Elle permet de quantifier l'intensité du couplage fonctionnel entre un RCPG d'intérêt et les protéines G_i. Brièvement, les échantillons sont homogénéisés dans le tampon de liaison (50 mM TrisHCl, 3 mM MgCl2, 0.2 mM EGTA, 100 mM NaCl, pH7.4). Ces homogénats sont incubés 1h à 25°C en présence de 0,1nM de [^{35}S]-GTPγS, de 30 µM de GDP et de concentrations variables (10^{-7}, 10^{-6} et 10^{-5} M) de l'agoniste mu sélectif DAMGO. La radioactivité est quantifiée par compteur à scintillation liquide. La liaison non-spécifique est mesurée en présence d'un excès de GTPγS non radioactif (10 µM) et la liaison basale en l'absence d'agoniste (Pradhan et al., 2009).

Analyse statistique

Les résultats sont exprimés et présentés sous la forme de la moyenne ± l'erreur standard. Le pourcentage d'activation de la liaison de [^{35}S]-GTPγS stimulée par le DAMGO est analysé par une ANOVA à mesures répétées. Le type de virus injecté (GFP/Cre) est le facteur interindividuel. La concentration de DAMGO est le facteur intra-individuel.

b) Résultats

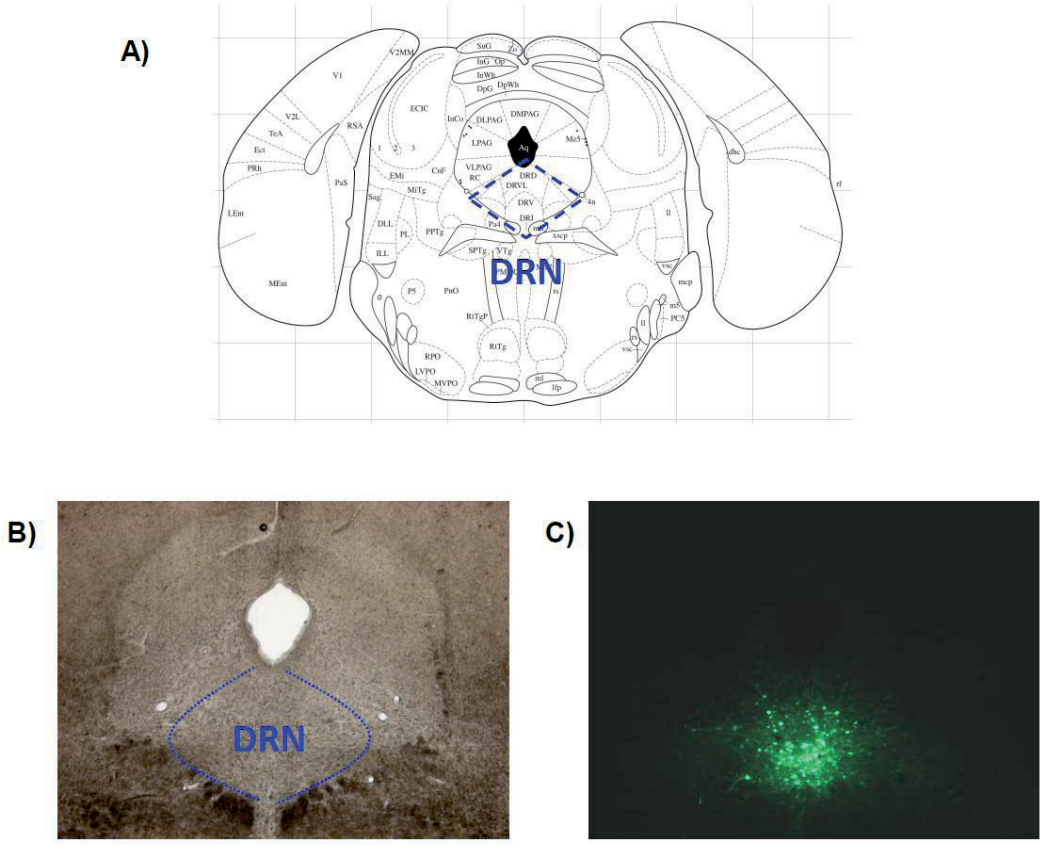


Figure 28. Injection de virus recombinants AAV_2 par chirurgie stéréotaxique dand le noyau du raphé dorsal (DRN). (**A**) Représentation schématique d'une coupe coronale passant par le DRN (DRN, figure tirée de l'atlas du cerveau de souris de Paxinos et Franklin, (Paxinos and Franklin, 1997)). (**B**) Image représentative de microscopie à fond clair d'une coupe coronale passant par le DRN. (**C**) Image de microscopie à épifluorescence, sur la même coupe qu'en (B), du profil d'expression de la protéine fluorescente eGFP après injection dans le DRN d'un vecteur viral recombinant AAV_2 exprimant cette protéine (volume injecté :1,5 µl, coordonnées d'injection par rapport au lambda : LM (+0 mm); AP (-0,3); AP (+3,55)).

La figure 28 illustre le profil d'expression de la GFP obtenu après injection du vecteur viral dans le DRN. Ce résultat montre que dans nos conditions, nous ciblons grâce au vecteur viral une grande partie du DRN dans l'axe coronal de cette structure. L'analyse de coupes sériées successives dans l'axe rostro-caudal montre de façon similaire qu'une grande partie de la structure est ainsi ciblée.

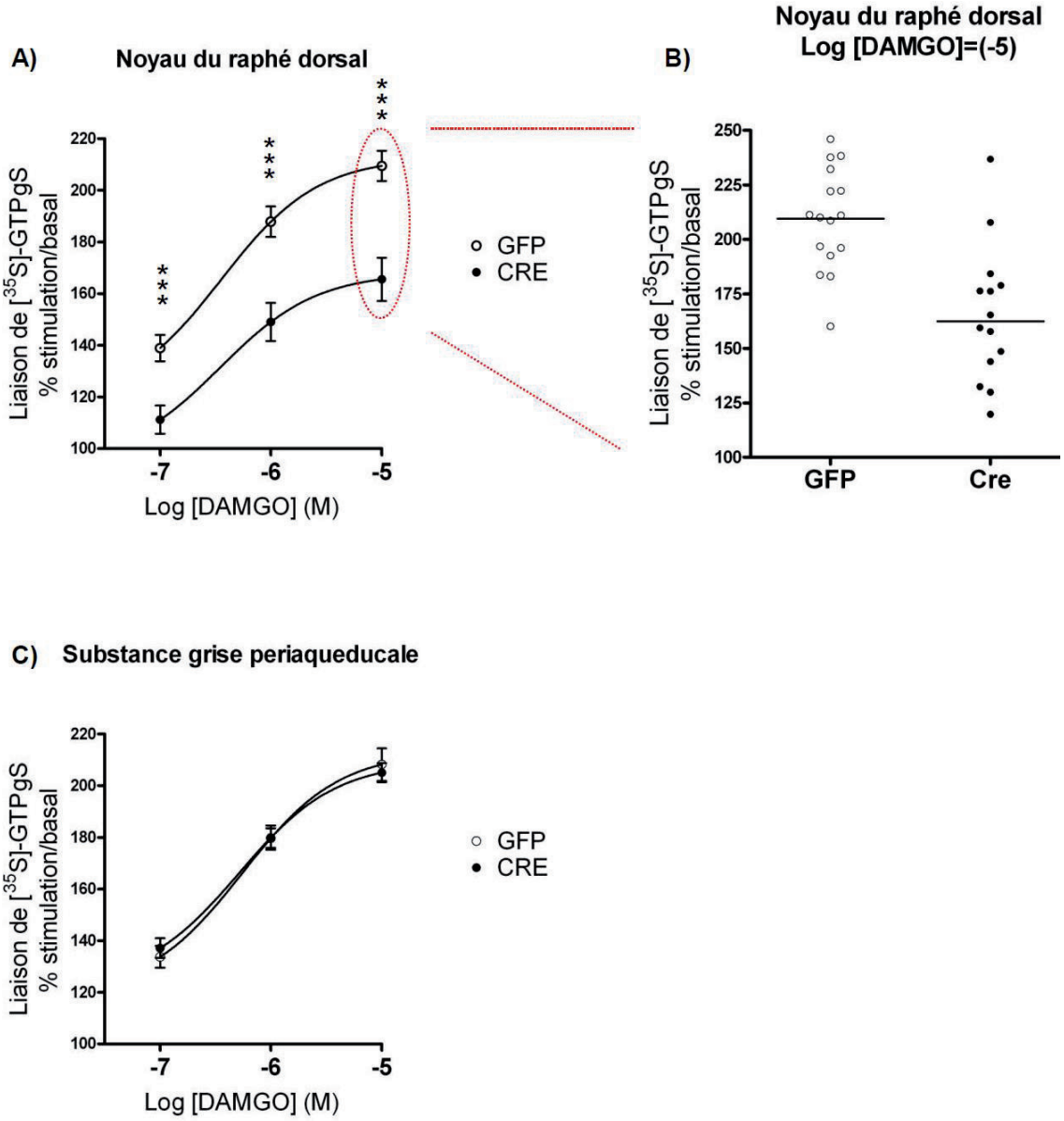


Figure 29. Knockout conditionnel du récepteur mu obtenu spécifiquement dans le noyau du raphé dorsal (DRN) par injection d'un vecteur viral AAV_2-Cre chez des souris mu « floxées ». Activité de liaison du [^{35}S]-GTPγS mesurée après stimulation du récepteur mu (pour 3 concentrations de l'agoniste, DAMGO), dans le DRN (**A**) ou dans la substance grise périaqueducale (PAG) (**C**), chez des souris ayant reçu 4 semaines auparavant une injection dans le DRN d'un vecteur viral AAV_2-Cre (CRE) ou AAV_2-GFP (GFP). (**B**) Activité de liaison du [^{35}S]-GTPγS mesurée individuellement chez chaque souris dans le DRN, après stimulation maximale du récepteur mu (log[DAMGO]=(-5) M). Les

résultats sont présentés sous la forme de la moyenne ± l'erreur standard (n=14-16/condition expérimentale). *** p<0,001 indique un effet significatif du vecteur viral AAV_2-Cre par rapport au vecteur viral contrôle AAV_2-GFP.

Dans le DRN (figure 29A), l'analyse statistique montre que l'injection d'un virus exprimant la Cre-recombinase induit une forte diminution de l'activité du récepteur mu [F(1,56)=19,35 ; p<0,0001]. Les activités maximales (concentration de DAMGO de 10-7 M) du récepteur mu dans les groupes GFP et Cre étaient respectivement de 209,4±5,9% et de 165,5±8,4% soit une diminution d'environ 40%. L'activation du récepteur, comme attendu, augmente avec la concentration d'agoniste utilisée [F(5,56)=224,3 ; p<0,0001]. L'ANOVA détecte également une interaction entre les 2 facteurs [F(5,56)=4,1 ; p=0.022] et les analyses à postériori indique que l'activité du récepteur mu est diminuée dans le groupe Cre pour chacune des 3 concentrations de DAMGO utilisées (10^{-7} M, p<0,001; 10^{-6} M, p<0,001; 10^{-5} M, p<0,001).

L'analyse par souris individuelles (figure 29B) montre que l'activité du récepteur mu chez les souris contrôles (GFP) est variable d'un individu à l'autre. Elle confirme également que l'intensité du knockout conditionnel obtenu est variable d'un individu à l'autre dans le groupe Cre. La médiane d'activation du récepteur mu (à la concentration maximale de DAMGO) dans le groupe Cre se situe à hauteur de la valeur la plus faible observée dans le groupe contrôle. On peut ainsi considérer de façon approximative que pour la moitié des animaux du groupe Cre, soit 7 souris sur 14, l'injection de virus a bien ciblé le DRN (ce qui correspondrait pour cette expérience à un taux de réussite de la stéréotaxie de 50% environ).

Suite à l'infection virale dans le DRN, nous avons aussi évalué l'activation du récepteur mu dans une région voisine du DRN, la PAG (figure 29C). Dans cette région, l'injection de virus Cre (dans le DRN) est sans effet sur l'activité du récepteur mu [F(1,54)=0,001 ; p=0.98]. Comme dans le DRN, l'activation du récepteur augmente avec la concentration d'agoniste utilisée [F(2,54)=317,7 ; p<0,0001]. Enfin, il n'y a pas d'interaction entre ces 2 facteurs [F(2,54)=0,658 ; p=0,52].

c) Discussion

Nos résultats démontrent la faisabilité technologique du cKO du récepteur mu dans le DRN par injection de la Cre-recombinase. Ce cKO semble restreint à la structure visée. En effet, l'activité du récepteur mu n'est pas modifiée dans la PAG après injection stéréotaxique des virus dans le DRN. Nous quantifions actuellement l'activité du récepteur mu dans le MRN, une autre structure proche du DRN. Les résultats préliminaires semblent indiquer une activité du récepteur mu non modifiée dans cet autre noyau sérotoninergique. Ainsi, le knockout conditionnel obtenu dans nos conditions est limité au DRN, confirmant le profil anatomique d'expression de la GFP observé dans nos conditions de stéréotaxie (figure 29B).

Bien que les données électrophysiologiques disponibles chez le rongeur suggèrent que le récepteur mu est principalement exprimé dans le DRN par des interneurones GABAergiques locaux (Tao and Auerbach, 1995; Tao and Auerbach, 2002a; Tao and Auerbach, 2002b; Tao and Auerbach, 2005), l'injection du virus dans le DRN pourrait induire une modification de l'activité du récepteur dans des régions innervées par le DRN, correspondant à la suppression de récepteurs soumis à un transport axonal antérograde. Nous quantifions donc actuellement l'activité du récepteur mu dans le nucleus accumbens, une structure innervé par le DRN exprimant fortement le récepteur mu et impliquée dans les comportements de consommation de drogues d'abus et de type dépressif chez le rongeur (voir introduction).

Le cKO que nous obtenons dans nos conditions est partiel, puisque l'activité maximale du récepteur mu (pour la plus forte concentration de DAMGO, voir résultats) est diminuée d'environ 40% par l'injection d'un virus AAV exprimant la Cre-recombinase. Plusieurs facteurs expérimentaux contribuent à cet effet partiel. Il est techniquement très difficile de vérifier chez un même animal à la fois la zone infectée par le virus AAV_2 et l'activité du récepteur mu. Une approche consisterait à réaliser une détection par immunohistochimie du récepteur mu et une visualisation directe de la fluorescence de la GFP sur des coupes sériées de tissu fixé. Cette approche permettrait théoriquement de quantifier le niveau d'expression du récepteur mu uniquement chez les animaux pour lesquels l'injection stéréotaxique a bien ciblé le DRN. Cependant, le niveau d'expression du récepteur mu dans le DRN est moyennement élevé comparé à d'autres structures (habenula, thalamus par exemple), et les anticorps disponibles actuellement pour ce récepteur ne garantissent pas une spécificité totale dans cette structure. Une autre possibilité consisterait à quantifier l'activité de liaison du [^{35}S]-GTPγS du récepteur mu sur coupes de tissu frais, par la technique d'autoradiographie (que nous avons déjà utilisée pour le récepteur 5-HT_{1A}, voir l'article 3). Il serait alors nécessaire de post-fixer certaines coupes de tissu pour la visualisation de la GFP, ce qui est techniquement incertain. Nous avons donc choisi de quantifier directement l'activité du récepteur mu sur homogénat de tissu après micro-prélèvement du DRN, stratégie qui par définition ne permet pas de vérifier les sites anatomiques d'expression de la GFP.

Ainsi l'intensité du cKO que nous avons mesurée correspond à une moyenne combinant les animaux ayant reçu l'injection virale dans le DRN (réussite de la stéréotaxie) ou dans une autre structure (échec). Enfin, il faut noter qu'une minorité de récepteurs mu dans le DRN serait présent sur les terminaisons axonales d'afférences glutamatergiques (i.e. récepteurs pré-synaptiques, chez le rat, (Tao and Auerbach, 2002b)) : l'activation de ces récepteurs aurait donc un effet excitateur sur les neurones sérotoninergiques. Le sérotype AAV_2 est réputé pour être faiblement transporté de façon rétrograde après injection intracérébrale. Ces récepteurs mu pré-synaptiques éventuellement présents chez la souris ne serait pas affectés par l'injection de virus dans nos conditions : ils participeraient donc dans l'activité résiduelle du récepteur mu.

Nous avons entrepris très récemment l'étude de l'impact de ce cKO sur l'abstinence à l'héroïne. Deux cohortes d'animaux (n=100 au total) recoivent des injections de virus dans le DRN. Puis, 4 semaines plus tard, nous débuterons le traitement héroïne escaladant. Nous faisons l'hypothèse que le phénotype de retrait social induit après 4 semaines d'abstinence à l'héroïne devrait

être retrouvé chez les animaux contrôles (GFP) et atténué par le cKO (Cre) du récepteur mu dans le DRN. Pour ces cohortes d'animaux, nous vérifierons après les tests comportementaux l'expression de la GFP dans le DRN. Nous ne conserverons pour l'analyse finale des effets comportementaux du cKO que les animaux pour lesquels nous aurons ainsi démontré que l'injection stéréotaxique a bien ciblé le DRN.

Expérience 6. Modification de l'expression des ARN messagers et micro-ARN dans le noyau du raphé dorsal au cours de l'abstinence à l'héroïne et du traitement antidépresseur.

Après l'invention de la PCR et la révolution de la biologie moléculaire dans les années 80 et 90, la biologie connait depuis une dizaine d'années une avancée remarquable grâce aux progrès des approches dites « haut-débit », c'est-à-dire permettant d'analyser simultanément dans un échantillon donné des milliers de molécules. Ces approches nécessitent une collaboration étroite entre bioinformaticiens et biologistes pour appréhender les grandes quantités de données ainsi générées.

En parallèle, un autre évènement majeur depuis environ une dizaine d'années, et en particulier en neurosciences, est l'avènement de l'épigénétique, définie comme l'étude des mécanismes de transmission de caractéristiques phénotypiques non portées par des modifications de la séquence d'ADN. On inclut généralement dans cette définition :

- les modifications post-translationnelles des histones, les composants protéiques majeurs de la chromatine, qui déterminent son état de compaction et ainsi l'activité transcriptionnelle du génome (Borrelli et al., 2008). Selon le type de modification envisagée (acétylation, méthylation, sumoylation, etc…), l'effet sera positif ou négatif sur l'expression des gènes selon des combinaisons complexes parfois appelées le « code histone »,

- la méthylation de l'ADN, se produisant principalement sur des îlots CpG de l'ADN (Yu et al., 2012), est associée classiquement à une inhibition de l'expression des gènes. Nous avons mentionné dans notre introduction un bel exemple de recherche bio-médicale translationnelle mettant en jeu la méthylation de l'ADN et concernant les mécanismes d'adaptation au stress précoce (voir introduction, le cerveau social). Récemment, un travail merveilleux de simplicité a démontré que cette marque épigénétique (5-méthyl-cytosine, 5-mC) peut subir une modification biochimique supplémentaire produisant un « 6ème nucléotide» particulièrement enrichi dans le cerveau, la 5- hydroxy-méthyl-cytosine (5-hmC) (Kriaucionis and Heintz, 2009).

- les miR, oligonucléotides endogènes correspondant à des ARN non codants, qui régulent par des mécanismes post-translationnels l'expression des gènes.

Nous avons débuté l'étude du rôle des miR dans notre modèle murin d'abstinence aux opiacés, et nous développerons brièvement quelques unes de leurs caractéristiques élémentaires. Les miR ont été découverts de façon fortuite par des expériences devenues célèbres d'injection d'ARN dans des pétunias, avec l'objectif d'intensifier leur couleur pourpre. L'effet obtenu fut exactement inverse, avec certaines fleurs complètement blanches par endroits (Napoli et al., 1990). Puis, Fire et Mello (Prix Nobel de médecine en 2006) ont proposé en 1998 chez *C.Elegans* l'existence d'un mécanisme d'ARN interférence (Fire et al., 1998) mettant en jeu une machinerie enzymatique intracellulaire. Depuis, une explosion de travaux a démontré l'implication de l'ARN interférence et des miR dans d'innombrables domaines de la biologie (cancer, développement, par exemple) et leurs

potentialités thérapeutiques. En neurosciences, les mécanismes épigénétiques et leur existence dans les neurones, cellules par définition post-mitotiques, ont été parfois débattus. Néanmoins, de très nombreuses données sont actuellement disponibles, notamment dans les domaines de l'addiction (Robison and Nestler, 2011) et de la dépression (Sun et al., 2012).

Les gènes des miR (souvent organisés en clusters dans le génome) sont transcrits par l'ARN polymérase II, produisant des miR primaires (pri-miR). Puis, ces pri-miR sont clivés dans le noyau en précurseurs de miR (pre-miR, d'environ 70 paires de bases) par un complexe enzymatique comprenant notamment la protéine Drosha (Schratt, 2009). Les pre-miR sont ensuite transportés dans le cytoplasme. Enfin, la RNase Dicer produit des miR matures doubles brins (miR, environ 22 à 23 paires de base). Selon des mécanismes encore mal compris, la plupart du temps un seul de ces 2 brins est chargé dans le complexe RISC (*RNA induced silencing complex*), qui sera responsable des effets biologiques des miR. Le complexe RISC-miR cible ensuite les ARNm par complémentarité de bases imparfaite, et induit selon les cas une répression de leur traduction ou leur dégradation (Filipowicz et al., 2008).

Notre laboratoire dispose d'une solide expérience dans les études haut-débit et l'analyse de jeux de données importants (Becker et al., 2008; Befort et al., 2008b; Ghate et al., 2007). Afin d'identifier de nouveaux gènes et des réseaux de gènes impliqués dans les effets comportementaux de l'abstinence à l'héroïne et du traitement antidépresseur chronique, nous avons utilisé des technologies récentes disponibles à l'IGBMC : micro-puces à ADN (Affymetrix Mouse Gene 1.0 ST Array) et séquençage des petits ARN (Genome Analyser IIA). Nous souhaitons ainsi caractériser respectivement les modifications de l'expression des ARNm et des miR survenant dans le DRN, après 4 semaines d'abstinence à l'héroïne et suite au traitement antidépresseur. L'analyse des résultats de cette étude haut-débit est en cours, et pourrait initier de futures études dans notre laboratoire. Les premiers résultats, très préliminaires, sont présentés dans ce manuscrit. A notre connaissance, il s'agirait de la première étude analysant à l'échelle du génome entier les adaptations transcriptionnelles au sein du DRN dans un modèle d'addiction, ainsi que la première description du «miRNome» dans cette structure.

a) Matériel & méthodes

Schéma expérimental

Les souris reçoivent le traitement héroïne escaladant (débuté à l'âge de 10 semaines, comme précédemment), puis comme dans l'expérience 2 une nourriture contrôle « nature » ou la nourriture contenant de la FLX pendant 4 semaines. L'expérience a été répétée de manière indépendante sur 5 cohortes d'animaux de 16 animaux chacune. Les 80 souris sont réparties en 4 conditions expérimentales (voir schéma expérimental, figure 30): 1) souris ayant reçu des injections de solution saline et une nourriture « nature » (saline-nature, SN) : n=20 (4 souris/cohorte), 2) souris ayant reçu des injections de solution saline et une nourriture supplémentée en FLX (saline-FLX, SF) : n=20 (4 souris/cohorte), 3) souris abstinentes à l'héroïne ayant reçu une nourriture « nature » (héroïne-nature,

HN) : n=20 (4 souris/cohorte) et 4) souris abstinentes à l'héroïne ayant reçu une nourriture supplémentée en FLX (héroïne-FLX, HF) : n=20 (4 souris/cohorte). Les micro-prélèvements de DRN de 4 souris sont rassemblés afin obtenir pour chaque échantillon une quantité d'ARN suffisante pour l'hybridation sur puces Affymetrix (150 ng d'ARN total) et le séquençage des petits ARN (1 µg d'ARN total). De plus, nous avons caractérisé le miRNome du DRN en conditions basales chez des souris de souche C57BL/6J, à partir de 4 échantillons supplémentaires provenant de souris naïves. Ainsi, nous avons analysé 20 échantillons d'ARN total par l'approche des micro-puces à ADN et 24 échantillons d'ARN total par séquencage des petits ARN.

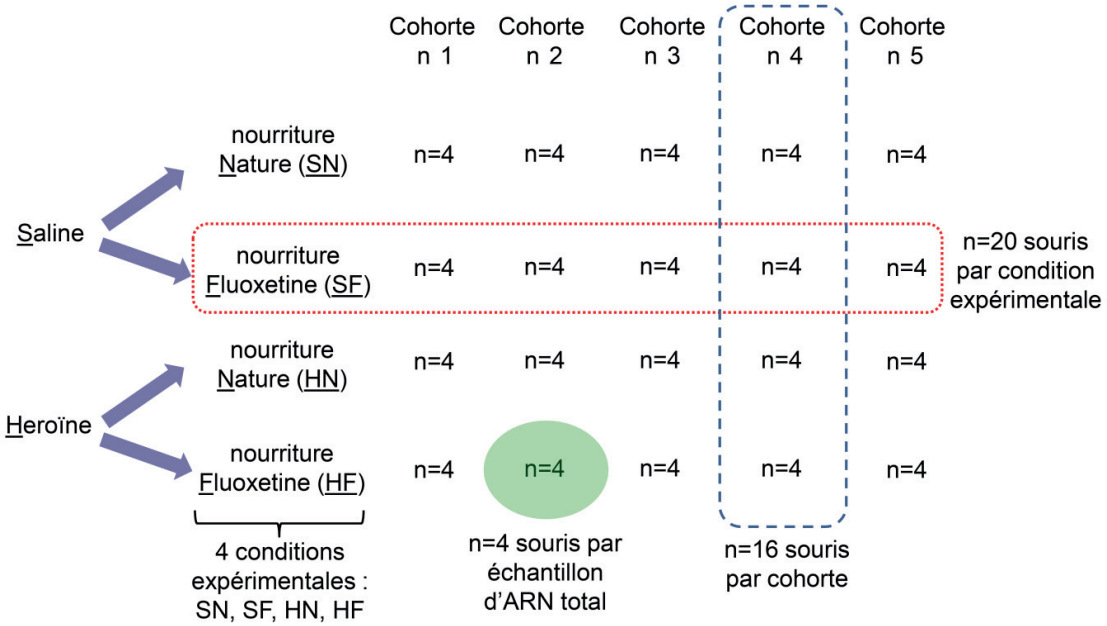


Figure 30. Schéma de l'expérience 6. Etude des modifications de l'expression des ARN messagers et des micro-ARN dans le noyau du raphé dorsal après 4 semaines d'abstinence à l'héroïne et suite au traitement antidépresseur chronique par la fluoxétine. Afin de minimiser la variabilité expérimentale, chaque condition expérimentale est analysée en réalisant 5 expériences, correspondant à 5 cohortes d'animaux traités indépendamment. Les micro-prélèvements du DRN de 4 souris sont rassemblés pour l'extraction de l'ARN total et constituent 1 échantillon. Chaque échantillon est utilisé à la fois pour l'hybridation sur puces d'expression (Affymetrix Mouse Gene 1.0 ST Array) et pour le séquençage (Illumina Genome Analyzer). Au total, nous avons analysés 20 échantillons (5 cohortes x 4 conditions expérimentales) par hybridation sur puces. Pour le séquençage, nous avons analysés 24 échantillons: les mêmes échantillons que pour les hybridations sur puces, plus 4 échantillons correspondant à des souris naïves, pour la caractérisation du miRNome du DRN en conditions basales (voir détails dans le texte).

Animaux et conditions d'hébergement

Les animaux utilisés (de souche C57BL/6JCrl) et les conditions d'hébergement sont identiques à ceux des expériences 1 et 2.

Préparation des ARN totaux

Pour chaque échantillon, l'ARN total est extrait en utilisant le kit miRNeasy en suivant les instructions du fabricant (Qiagen, France). Ce kit combine une extraction au Trizol et des colonnes de purification permettant de récupérer à la fois les ARNm et les petits ARN. Ces petits ARN, inférieurs à 200 nucléotides, correspondent aux miR et à différents types d'ARN non codants comme les piwi-ARN (qui représenteraient par exemple environ 1% des petits ARN dans l'hippocampe, contre 50% pour les miR (Lee et al., 2011)). Brièvement, le tissu est lysé mécaniquement (Polytron PT1600E) dans 700 µL de Qiazol Lysis Reagent, 140 µL de chloroforme sont ajoutés, et les tubes vigoureusement agités puis centrifugés 15 min à 4°C à 12000g. La phase supérieure aqueuse est récupérée, 525 µL d'éthanol 100% sont ajoutés et le mélange est immédiatement déposé sur une micro-colonne et centrifugé pour retenir les molécules d'ARN. Après des étapes de lavage pour éliminer le phénol et les contaminants, l'ARN est élué avec 30 µL d'eau RNase-free. Avant l'utilisation de ces échantillons pour l'hybridation sur puces et le séquençage, nous avons validé (concentration et qualité) les ARN obtenus par spectrophotométrie (NanoDrop® ND-1000 spectrophotometer, Thermo Scientific) et électrophorèse capillaire (Agilent Bio-Analyser).

Analyse transcriptionnelle par hypridation sur puces Affymetrix

Nous avons utilisé des puces d'expression Affymetrix Mouse Gene 1.0 ST Array destinées à mesurer l'activité transcriptionnelle (ARNm) totale des gènes les mieux annotés chez la souris. Ces puces utilisent des ADNc simple-brin biotinylés comme sonde dans une hybridation à une couleur où chaque échantillon à comparer est hybridé sur une puce distincte. Chaque hybridation est réalisée à partir de 150 ng d'ARN total par la plateforme « biopuces et séquençage » de l'IGBMC (http://www-microarrays.u-strasbg.fr).

.

Séquençage des petits ARN

Sur les mêmes échantillons d'ARN total que ceux utilisés pour l'analyse sur puces Affymetrix, nous avons aussi séquencé les petits ARN par la technologie Illumina, à partir d'1 µg d'ARN total (http://www-microarrays.u-strasbg.fr). Brièvement, le kit de préparation « TruSeq Small RNA sample » est utilisé pour construire les banques d'ADNc compatibles avec le système Illumina. Des adapteurs spécifiques (ciblant les miR et autres petits ARN ayant un groupement 3' hydroxyl résultant de clivages enzymatiques) sont ligués aux extrémités 3' et 5' des ARN. Une étape de transcription inverse permet d'obtenir un ADN simple-brin. Puis, des amorces spécifiques aux adapteurs sont utilisées pour produire des ADNc par PCR. Cette étape permet de sélectivement enrichir les fragments ayant les adapteurs à chacune des extrémités, et d'introduire une séquence tag (« index tag ») qui facilitera le séquençage par une approche de « *multiplexing* » ultérieurement. Cette banque est ensuite purifiée sur gel par électrophorèse, validée puis séquencée (sur 36 paires de base) en

utilisant le système Illumina multiplexing (Illumina Genome Analyzer II), permettant le séquençage de plusieurs échantillons (48 *index tags* au maximum) dans une même expérience de séquençage. Pour notre étude, 5 échantillons ont été inclus sur chaque ligne de séquencage. Sachant qu'une ligne de séquençage permet de lire en moyenne 30 millions de séquences (« reads »), cette approche produit environ 5 millions de séquences pour chacun de nos 24 échantillons (20 échantillons pour l'étude sur l'abstinence et 4 pour la caractérisation du miRNome du DRN chez des souris naïves). Ces paramètres ont été choisis au préalable sur la base d'expériences similaires de séquençage de petits ARN réalisées par la plateforme de biopuces de l'IGBMC.

Analyse bio-informatique et statistique

Les analyses bioinformatiques de l'expérience 6 sont conduites en collaboration avec les bio-informaticiens de la plateforme de biopuces de l'IGBMC. Après hybridation, un niveau d'expression est obtenu pour chaque transcrit présent sur les puces Affymetrix, grâce à une normalisation par la méthode RMA (*Robust Multi-array Average*) prenant en compte l'ensemble des sondes (oligonucléotides de 25 bases distribués au hasard sur l'ensemble de la puce) ciblant un même transcrit (avec une médiane de 26 sondes par transcrit). Les niveaux d'expression obtenus subissent ensuite une transformation logarithmique en base 2. Puis les données transformées sont analysées en utilisant le logiciel GeneSpring (Agilent technologies), permettant une analyse statistique et une visualisation rapides des données de transcriptomique. Brièvement, nous avons réalisé pour chaque transcrit une analyse de la variance (ANOVA) à 2 facteurs (traitements héroïne et FLX), comme lors de l'analyse des tests comportementaux.

Le séquençage produit des millions de séquences de 36 paires de base. La première étape consiste à reconnaître et à enlever dans ces séquences les parties correspondant aux adaptateurs utilisés lors de la construction des banques (en utilisant le logiciel libre cut-adapt, http://code.google.com/p/cutadapt/). Puis, dans une étape dite de *multiple mapping* (certains miR étant transcrits à partir de plusieurs loci), les petits ARN séquencés sont alignés sur le génome (grâce au logiciel libre Bowtie, http://bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml). Cet alignement est réalisé en utilisant la base de données de référence des miR chez la souris (miRBase version 18, http://www.mirbase.org/). Enfin, on utilise la suite logicielle R pour (i) normaliser les niveaux d'expression des miR entre les différents échantillons étudiés et (ii) réaliser une analyse statistique des variations d'expression des miR dans nos différentes conditions expérimentales (analyse d'expression différentielle). Grâce au logiciel libre DESeq (http://www-huber.embl.de/users/anders/DESeq/) basé sur la suite R (Anders and Huber, 2010) et en utilisant le modèle statistique dit linéaire généralisé (*generalized linear model*, GLM), nous avons réalisé une analyse statistique à 2 facteurs (traitements héroïne et FLX) de l'expression différentielle des miR. Enfin il est possible d'identifier, dans les données de séquençage des petits ARN, de possibles nouveaux miR qui n'auraient pas encore été annotés. Nous avons utilisé l'algorithme miRDeep 2, qui permet une prédiction *in silico* basée sur un modèle probabiliste de la biosynthèse des miR. Ce modèle prend en compte la position et la fréquence des ARN séquencés pour évaluer (par un score

miRDeep2) la compatibilité avec la structure secondaire des pre-miR (voir (Friedlander et al., 2008) pour une description particulièrement didactique de l'algorithme).

b) Résultats

Préparation des ARN totaux

Les échantillons d'ARN total que nous avons obtenu après extraction présentaient des concentrations moyennes d'ARN très homogènes (ANOVA à 1 facteur, p=0,40) dans les 4 conditions expérimentales étudiées : SN, 125,0 ± 6,7 ng/µl; SF, 105,0 ± 8,1 ng/µl; HN, 114,8 ± 4,1 ng/µl; HF, 114,3 ± 11,4 ng/µl.

Puces Affymetrix

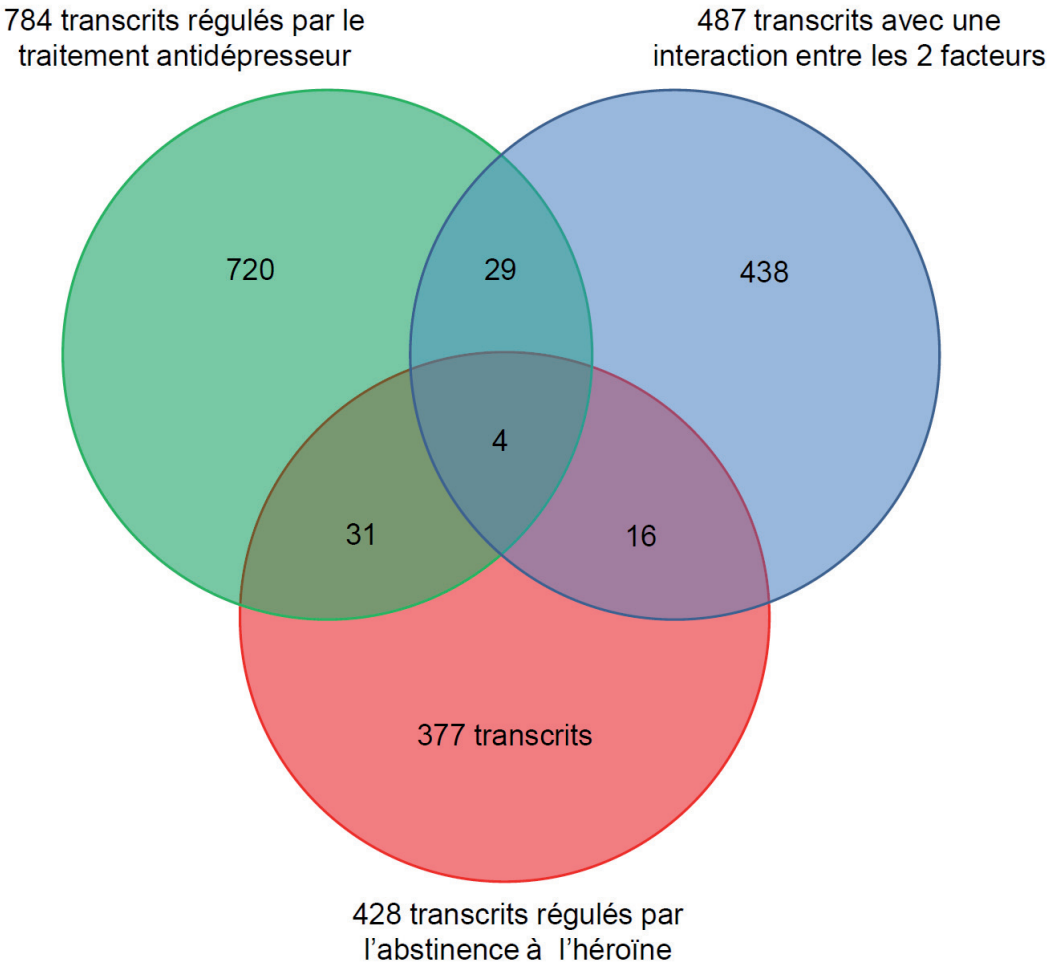


Figure 31. Diagramme de Venn: analyse transcriptionnelle par hybridation sur puces Affymetrix, illustrant le nombre d'ARN messagers (transcrits) dont l'expression est modifiée par l'abstinence à l'héroïne (rouge), par le traitement antidépresseur (vert) ou suivant une interaction entre ces 2 facteurs (bleu).

L'ensemble des contrôles qualité réalisés par la plateforme de biopuce, lors de l'hybridation des échantillons sur les puces et le calcul des intensités de fluorescence, sont satisfaisants. Nous avons donc débuté l'analyse d'expression différentielle. Lorsqu'une correction pour la réalisation de tests statistiques multiples (autant de tests que de transcrits analysés) est appliquée, nous n'observons aucune régulation significative de l'expression des ARNm entre nos conditions expérimentales. Sans appliquer cette correction, nous mettons en évidence des régulations significatives pour 1615 gènes (figure 31). On peut remarquer que le traitement FLX, arrêté 48 heures avant le sacrifice des animaux, semble induire beaucoup plus de régulations (720+31+4+29=794 transcrits) que le traitement à l'héroïne (377+31+4+16=428 transcrits), dont la dernière injection a eu lieu 4 semaines avant le sacrifice des animaux. Par ailleurs, un grand nombre de gènes présentent un profil de régulation correspondant à une interaction entre ces 2 facteurs (438+29+4+16=487 transcrits).

Dans une deuxième étape, notre laboratoire va prochainement confirmer par une approche de PCR quantitative (qPCR) certaines de ces régulations, en se concentrant sur une sélection de gènes parmi ces 1615 cibles potentielles (voir la discussion).

Séquençage des petits ARN

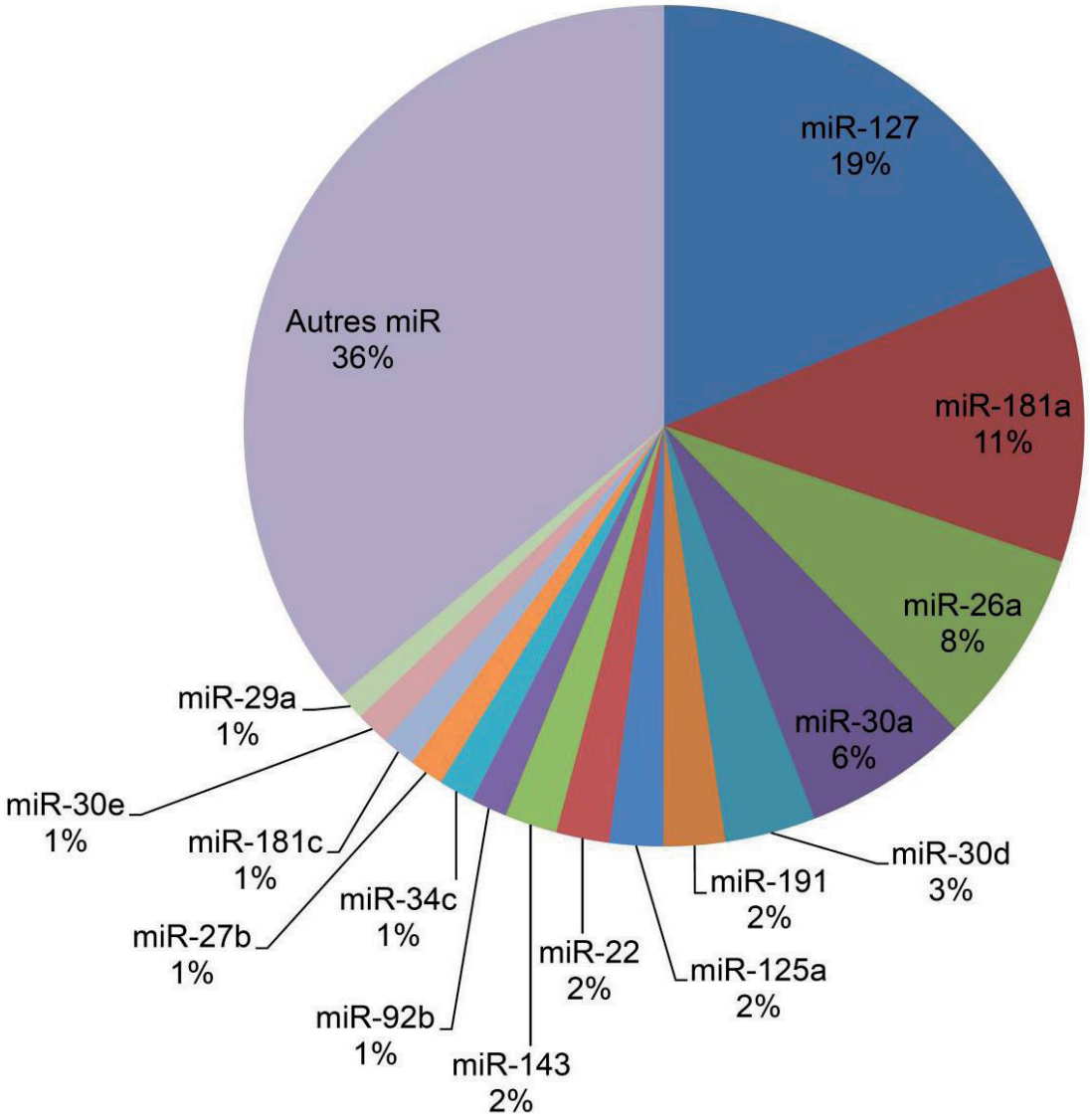


Figure 32. Représentation des 15 micro-ARN (miR) les plus exprimés dans le noyau du raphé dorsal, chez des souris naïves adultes de souche C57BL/6J. Les résultats sont exprimés en pourcentage des miR totaux. Par exemple, le nombre de séquences annotées sur le gène du miR-127 représente 19% du nombre total de séquences annotées sur le génome (voir matériel et méthodes).

Rang	DRN	CF (Juhila et al.)	Hipp (Juhila et al.)
1	miR-127 (19%)	let-7c (21%)	let-7c (27%)
2	miR-181a (11%)	miR-128 (20%)	let-7a (9%)
3	miR-26a (8%)	let-7b (9%)	let-7b (9%)
4	miR-30a (6%)	miR-29a (9%)	miR-128 (8%)
5	miR-30d (3%)	let-7a (7%)	miR-29a (8%)
6	miR-191 (2%)	let-7f (4%)	let-7f (7%)
7	miR-125a (2%)	miR-124 (3%)	miR-9 (4%)
8	miR-22 (2%)	let-7e (3%)	let-7e (3%)
9	miR-143 (2%)	miR-9 (3%)	let-7d (2%)
10	miR-92b (1%)	let-7d (2%)	miR-124 (2%)
11	miR-34c (1%)	miR-132 (1%)	let-7g (2%)
12	miR-27b (1%)	miR-125b-5p	miR-137 (2%)
13	miR-181c (1%)	let-7g (1%)	miR-26a (2%)
14	miR-30e (1%)	miR-137 (1%)	miR-99b (1%)
15	miR-29a (1%)	miR-26a (1%)	miR-125b (1%)
Autres micro-ARN	*36%*	*14%*	*13%*

Tableau 1. Comparaison des 15 micro-ARN (miR) les plus exprimés dans 3 régions du cerveau chez la souris adulte de souche C57BL/6J: le noyau du raphé dorsal (DRN), le cortex frontal (CF) et l'hippocampe (Hipp). Nous comparons ici les données de notre étude dans le DRN avec les données publiées récemment par Juhila et collaborateurs (Juhila et al., 2011) concernant les 2 autres régions. Les résultats sont exprimés en pourcentage des miR totaux. Dans le DRN par exemple, le

nombre de séquences annotées sur le gène du miR-127 représente 19% du nombre total de séquences annotées sur le génome (voir matériel et méthodes).

Afin d'apprécier les variations régionales d'expression des miR dans le cerveau de souris adulte, nous proposons de façon très préliminaire une comparaison avec les données publiées récemment par Juhila et collaborateurs (Juhila et al., 2011) et obtenues selon une méthodologie comparable à la notre : extraction d'ARN total par le kit Illumina (TruSeq Small RNA sample) et séquençage de 36 paires de base par Genome Analyzer des miR exprimés dans l'hippocampe et le cortex préfrontal, chez des souris naïves de souche C57BL6J adultes (7 semaines). Basé sur les données publiées de cette étude, nous avons représenté dans la figure 32 les 15 miR les plus fortement exprimés (en % des miR totaux) dans ces 2 régions (données (Juhila et al., 2011)), ainsi que dans le DRN (nos propres données). Pour cette comparaison, nous avons utilisé uniquement nos résultats chez des souris naïves (voir le schéma expérimental).

Il faut noter tout d'abord que dans notre étude, l'ensemble des miR situés au-delà du 15ème rang en termes de niveau d'expression ("autres miR" dans le tableau 1), représente 31% des miR totaux, contre seulement 14 et 13% respectivement dans le cortex frontal et l'hippocampe. Il est probable que cette différence tienne au fait que nous avons utilisé pour l'annotation des données du séquençage (voir matériel et méthodes) une version plus récente de miRBase (version 18) que celle utilisée par Juhila et al (version 11). La version 18 de miRBase comprend beaucoup plus d'annotations (18226 pre-miR annotés toutes espèces confondues) que la version 11 (2909 pre-miR) (source : ftp://mirbase.org/pub/mirbase/CURRENT/README)). Dans nos données (DRN), un plus grand nombre de miR étant détectés, les miR faiblement exprimés représenteraient un pourcentage plus important des miR totaux que dans les données de Juhila et al (cortex frontal ou l'hippocampe).

Les différences de profil d'expression des miR entre différentes régions cérébrales semblent majeures. Dans le cortex frontal et l'hippocampe, la famille de miR let-7 (let-7a, b, c, d, e, f et g, en rouge dans le tableau 1) représente respectivement 47 et 59% des miR totaux. Les miR de cette famille ont récemment été impliqués dans la tolérance à l'analgésie morphinique (He et al., 2010), et pourraient intervenir dans les adaptations induites par l'héroïne. Pourtant, dans le DRN aucun des membres de la famille let-7 n'apparait dans les 15 miR les plus fortement exprimés. Ces miR de la famille let-7 sont bien présents dans le DRN (données non présentées), mais sont situés au-delà de la 20ème position et représentent donc chacun moins de 1% des miR totaux. Par ailleurs, parmi les 15 miR les plus fortement exprimés dans le DRN, seuls 2 (miR-26a et miR-29a, en bleu dans le tableau 1) sont présents parmi les miR majoritairement exprimés dans le cortex frontal et l'hippocampe. Afin d'affiner cette comparaison, il sera nécessaire d'annoter les données brutes de séquençage de l'étude de Juhila et al. en utilisant la version 18 de miRBase.

A)

MiR présumé (coordonnées)	MiR homologue	Score miRDeep2	Probabilité de vrai positif
chr17:25382489	rno-miR-3547	5844,6	90
chr8:74993908	hsa-miR-3620	1269,5	90
chr4:120645857	hsa-miR-1304-3p	442,9	90
chr12:33947684	hsa-miR-589-3p	141,6	90
chr2:67513508	hsa-miR-181a-2-3p	5,5	89
chr11:97007673	rno-miR-3583-3p	5,4	89
chr9:107428753	hsa-miR-3686	5,3	89
chrX:143433962	rno-miR-3552	4,9	82
chr9:72981988	hsa-miR-371b-3p	4,6	82
chr2:153243613	hsa-miR-2116-3p	1,2	59

B)

MiR présumé (coordonnées)	MiR homologue	Score miRDeep2	Probabilité de vrai positif
chr11:116938679	Ø	270,4	90
chr10:80878979	Ø	150,4	90
chr11:109522529	Ø	134,6	90
chr4:46508090	Ø	99	90
chr12:103826766	Ø	98,4	90
chr13:25071920	Ø	73,9	90
chr2:132536500	Ø	71,6	90
chr11:121248453	Ø	69,1	90
chr18:61113522	Ø	60,6	90

Tableau 2. Identification par l'algorithme miRDeep2 de nouveaux micro-ARN (miR) présumés dans le noyau du raphé dorsal. Nous mentionnons ici une sélection de miR présumés pour lesquels un miR homologue est déjà annoté (**A**) ou non (**B**) dans une autre espèce : hsa-miR-xxx et rno-miR-xxx indiquent des miR déjà annotés chez l'homme (*homo sapiens)* ou le rat (*rattus norvegicus*),

respectivement. Pour chaque miR présumé, nous donnons la probabilité qu'il corresponde véritablement à un miR (probabilité de vrai positif) et le score miRDeep2 (voir matériel et méthodes).

Afin d'identifier de nouveaux miR, nous avons utilisé l'algorithme miRDeep2. Cet algorithme nous a permis d'identifier un grand nombre de séquences d'ARN pouvant correspondre à des miR. En considérant un seuil (*cut-off)* de 1 pour le score miRDeep2, comme suggéré par les concepteurs de l'algorithme (Friedlander et al., 2008; Friedlander et al., 2012), nous identifons 478 séquences pouvant correspondre à de nouveaux miR. En considérant un seuil plus exigeant (plus « stringent ») de 10, nous identifions 99 possibles nouveaux miR. Ces miR putatifs peuvent également être classés selon leur probabilité de vrai positif, ainsi que par leur niveau absolu d'expression dans le DRN. Nous considérons ici, de façon arbitraire, les nouveaux miR pour lesquels plus de 100 séquences ont été comptabilisées dans les 4 échantillons étudiés (souris naïves, voir schéma expérimental et matériels et méthodes). Parmi ces séquences, certaines présentent une homologie avec des miR déjà annotés dans d'autres espèces (principalement chez l'homme et le rat, les 2 autres espèces les plus étudiées par séquençage). A titre d'exemple, nous présentons dans le tableau 2 une liste de nouveaux miR possibles, organisés en 2 groupes :

- tous les candidats pour lesquels un miR homologue est déjà annoté chez le rat (rno-miR-3547 par exemple) ou chez l'homme (hsa-miR-3620), indépendamment de leur probabilité de vrai positif (tableau 2A),
- tous les candidats pour lesquels aucun miR homologue n'a été identifié jusqu'à présent et dont la probabilité de vrai positif est égale à 90% (tableau 2B).

Nous présentons en annexe 6 les séquences nucléotidiques des miR de ces 2 groupes.

Enfin, nous avons réalisé très récemment une analyse d'expression différentielle des miR dans nos différentes conditions expérimentales (abstinence héroïne et traitement FLX). Ces résultats ne sont pas présentés car trop préliminaires. Néanmoins, ils suggèrent que les traitements héroïne et FLX réguleraient chacun environ une vingtaine de miR lors de l'abstinence. De plus, plus de 80 miR montreraient un profil de régulation correspondant à une interaction entre ces 2 facteurs. De façon intéressante, certains nouveaux miR identifiés lors de l'analyse miRDeep2 montreraient une régulation significative à travers ces différentes conditions.

c) Discussion

Notre analyse transcriptomique pourrait permettre d'identifier des ARNm dont les niveaux sont régulés par l'abstinence à l'héroïne ou le traitement antidépresseur. Il est frappant de constater que sur le plan statistique, l'application d'une correction stricte pour la réalisation de tests multiples ne permet pas d'observer de régulation statistiquement significative, malgré un nombre très importants de réplicats (n=5). L'identification de régulations transcriptionnelles dans des échantillons de cerveau, même sur micro-prélèvements, est un véritable challenge si l'on considère l'étonnante hétérogénéité

cellulaire du système nerveux central (Okaty et al., 2011). De nombreuses techniques ont été proposées pour contourner cette difficulté et étudier des populations cellulaires d'intérêt, comme le tri de cellule par FACS (*fluorescence activated cell sorting*) (Lobo et al., 2006) ou une approche génétique de marquage (*tagging*) des riboprotéines présentes dans les ribosomes, structures cellulaires où a lieu la traduction des ARNm. Ce *tagging* peut-être réalisé par la production de souris transgéniques (BAC, pour *bacterial artificial chromosome*) exprimant une riboprotéine (L10a dans ce cas) marquée dans la population cellulaire d'intérêt (méthode "trap", pour *translating ribosome affinity purification*, voir (Doyle et al., 2008; Heiman et al., 2008)). Comme nous l'avons déjà mentionné, cette méthode a permis récemment d'identifier des neurones pyramidaux cortico-striataux responsables de la réponse aux antidépresseurs (Schmidt et al., 2012). Une approche à notre sens encore plus élégante a consisté à créer une souris génétiquement modifiée (stratégie de Knock-In, voir pour le détail de la construction génétique de cette souris (Sanz et al., 2009)) permettant de « tagger » les ribosomes lors d'un croisement avec une souris rapportrice Cre (exprimant la Cre-recombinase dans une population cellulaire spécifique). Cette dernière approche devrait permettre de tirer profit des nombreuses lignées de souris rapportrices Cre existantes (Gaveriaux-Ruff and Kieffer, 2007). Enfin, une approche similaire a très récemment été développée pour le marquage des miR (He et al., 2012).

Afin de confirmer la validité de nos résultats de transcriptomique (ARNm), nous souhaitons confirmer certaines des régulations observées dans une deuxième série d'expériences, en utilisant la qPCR, une technique « bas-débit » réputée plus sensible dans la détection des variations de niveaux d'expression (Befort et al., 2008a; Befort et al., 2008b). Parmi les 1615 gènes présentant une régulation statistiquement significative, nous nous concentrerons sur une liste raisonnable de candidats, et étudierons par qPCR 5% de ces gènes, soit environ 80 gènes. Ces 80 gènes seront choisis sur la base de deux critères principaux:

- la force de la régulation observée, en terme de facteur de changement (*fold change*, défini comme le rapport du niveau d'expression dans une condition expérimentale sur le niveau d'expression dans une autre condition),
- la significativité biologique de ces gènes candidats, par rapport aux résultats publiés dans la littérature et dans le cadre de notre modèle d'abstinence.

Nous avons également débuté la caractérisation du miRNome du DRN, ainsi que l'étude des régulations de l'expression des miR lors de l'abstinence à l'héroïne et du traitement FLX. Nous avons confronté le miRNome du DRN avec des données issues d'approches similaires récemment publiées pour d'autres régions du cerveau de souris (Juhila et al., 2011). Cette comparaison suggère que les miR pourraient montrer des profils d'expression extrêmement hétérogène à travers différentes structures corticales (cortex frontal, hippocampe) et non corticale (DRN). Il n'existe pas à l'heure actuelle, à notre connaissance, d'étude abordant directement cette question à partir de données de séquençage. Néanmoins, des études d'expression des miR par la technologie des puces chez le rat (Olsen et al., 2009) et la souris (Bak et al., 2008) ont montré que de nombreux miR présentent un enrichissement significatif entre différentes régions, en accord avec nos données.

En l'état actuel de nos connaissances parcellaires sur l'expression et la fonction des miR dans le cerveau murin, il est difficile de proposer des facteurs de variabilité d'expression des miR entre différentes structures cérébrales (composition en types cellulaires, origine embryologique, etc…). Par exemple, une recherche bibliographique rapide ne nous a pas permis d'identifier d'étude sur le rôle de miR-127 dans le DRN, le miR pourtant le plus abondant dans cette structure selon nos données. Ainsi, nous espérons que cette première caractérisation du miRNome dans le DRN constituera pour la communauté une ressource utile et permettra de suggérer de nouvelles pistes expérimentales. Etant données les très nombreuses fonctions physiologiques faisant intervenir le système sérotoninergique, la manipulation des niveaux de miR-127 dans le DRN (par exemple par une approche de LNA anti-sens, *Locked Nucleotidic Acid*) semble une perspective prometteuse.

Comme dans le cas des régulations de l'expression des ARNm, notre laboratoire va prochainement conduire des expériences de qPCR pour confirmer la régulation d'une sélection de miR candidats suite à l'abstinence à l'héroïne et au traitement antidépresseur. En conclusion, cette étude pourrait nous permettre de suggérer de nouveaux mécanismes moléculaires dans le DRN, à l'interface entre dépendance aux opiacés et désordres émotionnels.

DISCUSSION GENERALE

Le but de ce travail était d'élaborer un modèle murin de l'abstinence aux opiacés. Nous avons porté un intérêt particulier aux fonctions émotionnelles, pour établir un modèle de l'hypothèse physiopathologique de causalité entre dépendance aux opiacés, morphine et héroïne, et troubles dépressifs.

Plusieurs axes de recherche peuvent être envisagés pour affiner ce modèle. Tout d'abord, le protocole d'administration pourrait être adapté pour mieux refléter les patterns de prises chez l'homme. Ainsi, des protocoles d'auto-administration prolongée, par voie IV ou orale, pourraient permettre d'induire chez la souris des comportements compulsifs de prise de drogue (voir introduction). Il serait intéressant de caractériser les réponses émotionnelles d'animaux présentant ces comportements, au cours des périodes d'intoxication de ces protocoles et après des périodes d'abstinence. Nous faisons l'hypothèse qu'un mode de consommation compulsif pourrait induire des dysfonctionnements émotionnels plus prononcés.

Nous avons déjà mentionné qu'une activité anormale de l'axe HHS a été décrite chez des sujets abstinents après une dépendance aux opiacés (Li et al., 2008; Zhang et al., 2008). Une étude récente suggère que l'activité de l'axe HHS et le niveau d'anxiété pourraient être normalisés, mais les symptômes dépressifs persister, lors d'une prise en charge par TSO, suggérant une dissociation entre ces 2 composantes (Kakko et al., 2008). Dans notre modèle murin et en accord avec la littérature (Houshyar et al., 2003), nous retrouvons lors de l'abstinence à la morphine (voir chapitre V, article 2) une hypercorticostéronémie transitoire à l'issue du traitement chronique, qui régresse après 4 semaines d'abstinence. Ce résultat suggère que dans notre modèle également, les symptômes apparentés à la dépression et la perturbation de l'activité de l'axe HHS peuvent être dissociés. Cette activation de l'axe HHS secondaire au traitement morphinique chronique pourrait néanmoins contribuer à l'incubation des déficits comportementaux observés après 4 semaines, en induisant des adaptations neuronales dans les circuits extra-hypothalamiques du stress, l'amygdale notamment (Koob and Kreek, 2007; Koob, 2008; Koob and Le Moal, 2008; Koob, 2010; Zhou et al., 2010), ou en modulant le tonus sérotoninergique (Lanfumey et al., 2008). Il serait intéressant de tester cette hypothèse en étudiant l'effet du traitement morphinique chronique chez des souris ayant subi une surrénalectomie et supplémentées en corticostérone. L'absence de déficit chez ces animaux après 4 semaines révèlerait l'implication de l'axe HHS dans les effets de l'abstinence à la morphine.

Un autre axe de recherche possible, basé sur les données que nous avons présentées, consisterait à étudier les effets d'un traitement « de substitution » chez la souris. Dans cette optique, il serait intéressant de mettre au point l'administration d'un opiacé à longue durée d'action chez la souris (méthadone ou buprénorphine). Ceci permettrait, par analogie avec la situation clinique, de prévenir le sevrage lors de l'arrêt des injections d'héroïne et de substituer les injections i.p. (dont l'effet de pic plasmatique est important) par un tonus opioïde exogène constant ciblant le récepteur mu lors des 4 semaines d'abstinence. Chez les patients abstinents d'opiacés illicites la prévalence de l'EDM est forte même en cas de TSO bien suivi (voir chapitre III). Dans notre modèle, il serait utile de tester les

effets d'une telle « substitution » sur le retrait social et les comportements de résignation observés au décours d'un traitement opiacé escaladant, morphine ou héroïne. Nous utiliserions en préférence pour une telle substitution la méthadone plutôt que la buprénorphine. En effet, la méthadone présente un profil pharmacologique plus simple, ciblant uniquement le récepteur opioïde mu alors que la buprénorphine cible les récepteurs mu (agoniste) et kappa (antagoniste). De plus, nos données obtenues chez les souris KO kappa (expérience 3) suggèrent un effet protecteur de l'activation du récepteur kappa lors de l'abstinence. Peu d'études se sont intéressées à la méthadone chez la souris (Berrocoso and Mico, 2009; Enquist et al., 2012; Quillinan et al., 2011). Il conviendrait dans un premier temps d'étudier les effets potentiels sur les comportements sociaux et de type dépressif d'un traitement chronique à différentes doses de méthadone. Puis on choisirait pour traiter les souris abstinentes une dose sub-effective sans effet chez les animaux contrôles (par analogie avec notre choix d'une dose de FLX).

Les données présentées dans notre étude de l'abstinence à l'héroïne chez les animaux mutants KO kappa et KO delta suggèrent que l'activation chronique intermittente du récepteur mu lors du traitement opiacé initial modifie le fonctionnement du système opioïde endogène dans son ensemble. Comme nous l'avons mentionné pour chacun de ces 2 récepteurs, de tels adaptations au sein du système opioïde (*within-system*) ont déjà été décrites dans plusieurs structures suivant des protocoles variables d'administration d'opiacés. Dans le cadre de notre travail, nous proposons d'étudier ces éventuels mécanismes après traitement héroïne escaladant, en nous focalisant sur le DRN, mais aussi sur quelques structures clés dans la régulation de l'humeur : amygdale, hippocampe, cortex frontal, noyau accumbens. Dans cette optique, nous souhaitons comparer dans ces structures l'activité de liaison du [^{35}S]-GTPγS des récepteurs kappa et delta suite au traitement héroïne et après 4 semaines d'abstinence (en utilisant les agonistes de référence, respectivement le U50.488 et le SNC-80). Dans la même optique, nous proposons également d'étudier par HPLC le métabolisme des monoamines chez des souris KO kappa et KO delta, comme lors de notre étude sur l'abstinence morphinique (article 2).

L'ensemble de nos résultats indiquent que le retrait social est un symptôme robuste lors de l'abstinence aux opiacés, qui pour l'héroïne constitue un prodrome de l'apparition d'un comportement de résignation. Pour continuer d'aborder la problématique de la comorbidité, de futures études pourraient caractériser les réponses des animaux abstinents aux opiacés à différents types de stress. Bien sûr, le stress social (modèle de mise en échec social chronique) serait ici tout indiqué. Une sensibilisation croisée (*cross-sensitization*) entre stress social chronique et dépendance aux drogues d'abus a déjà été documentée. L'auto-administration (Covington and Miczek, 2001) et la préférence de place conditionnée par la cocaïne (Krishnan et al., 2007; McLaughlin et al., 2006) sont potentialisées au décours de l'exposition au stress social. Des données plus récentes indiquent que cette potentialisation de la recherche ou de la prise de drogue dépendrait étroitement pour la cocaïne du type de stress utilisé (Miczek et al., 2011) et pourrait ne pas se généraliser à l'héroïne (Cruz et al., 2011). On voit ainsi que les relations entre stress, humeur et fonction de récompense sont complexes. Sur la base de notre modèle, nous proposons de soumettre les animaux abstinents à l'héroïne au stress social chronique.

En conclusion, l'ensemble des données présentées dans ce manuscrit révèle la contribution du système sérotoninergique à l'apparition d'anomalies comportementales apparentées aux symptômes dépressifs (mais non anxieux) chez l'homme, lors de l'abstinence prolongée après un traitement opiacé chronique. Les mécanismes neurobiologiques qui sous-tendent ces déficits restent encore mal compris. Nous avons entrepris dans le DRN une vaste étude haut-débit qui devrait se poursuivre au laboratoire et pourrait permettre d'approfondir notre compréhension de certains de ces mécanismes.

Sur le plan épidémiologique, la comorbidité entre désordres émotionnels et addiction est depuis longtemps reconnue comme caractérisant l'ensemble des drogues d'abus, ce qui constitue probablement une de leurs caractéristiques communes notables. Notre laboratoire a mené récemment une caractérisation comportementale de l'abstinence pour plusieurs de ces drogues d'abus. Les résultats (Becker & Le Merrer, données non publiées) suggèrent que de façon similaire à notre travail sur les opiacés, l'abstinence à ces différentes drogues d'abus induit des troubles divers des comportements sociaux. Ainsi, nous proposons que le système opioïde, acteur majeur des effets récompensant de ces drogues, constitue un acteur majeur à l'interface du stress, de la régulation de l'humeur et de la vie sociale.

CONCLUSION

Au cours de ce travail, nous avons abordé l'étude des liens complexes entre dépendance aux opiacés et dépression, deux pathologies qui constituent l'une pour l'autre un facteur de risque majeur. Cette comorbidité forte impose notamment au médecin généraliste, qui est en première ligne, de la dépister systématiquement lors de l'établissement d'un de ces diagnostics. De plus, elle représente un élément péjoratif du pronostic, qui fait craindre une prise en charge difficile, émaillée d'épisodes de rechute.

Sur le plan thérapeutique, depuis leur introduction en France, les traitements de substitution aux opiacés ont permis d'améliorer la qualité de vie des patients et de diminuer considérablement les comorbidités somatiques associées aux pratiques d'injection intraveineuse. Néanmoins, la question du choix entre la méthadone et la buprénorphine en cas d'EDM associé, et plus généralement leurs effets respectifs sur l'humeur, sont selon nous insuffisamment discutés dans la littérature et appellent de nouvelles études spécifiquement conçues dans cette perspective. Par ailleurs, l'utilisation des antidépresseurs reste débattue, et probablement d'un intérêt modéré. Ces traitements doivent s'intégrer dans une approche pluridisciplinaire, en étroite collaboration entre médecin généraliste, psychiatre, travailleur social, infirmier et psychologue, entre autres intervenants.

Outre la nécessité d'études cliniques supplémentaires, les difficultés soulevées par ces patients soulignent l'urgence de la recherche fondamentale et de la modélisation animale. Nous avons rappelé dans ce mémoire les progrès importants qui sont actuellement accomplis dans de nombreux laboratoires. Enfin, nous avons présenté notre contribution à l'élaboration d'un modèle murin de symptômes de type dépressif, se développant lors de l'abstinence aux opiacés et faisant intervenir des modifications persistantes du système sérotoninergique. L'approfondissement de ces approches précliniques nécessite un dialogue quotidien entre cliniciens et chercheurs. Il devrait permettre d'améliorer notre compréhension des mécanismes neurobiologiques contribuant à ce double diagnostic chez l'homme et ainsi ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques.

ANNEXES

ANNEXE 1

Révision proposée (en anglais) de la définition du « trouble d'usage de substance » (*substance-use disorder*) pour la nouvelle classification DSM-V

A. A maladaptive pattern of substance use leading to clinically significant impairment or distress, as manifested by 2 (or more) of the following, occurring within a 12-month period:
   1. recurrent substance use resulting in a failure to fulfill major role obligations at work, school, or home (e.g., repeated absences or poor work performance related to substance use; substance-related absences, suspensions, or expulsions from school; neglect of children or household)
   2. recurrent substance use in situations in which it is physically hazardous (e.g., driving an automobile or operating a machine when impaired by substance use)
   3. continued substance use despite having persistent or recurrent social or interpersonal problems caused or exacerbated by the effects of the substance (e.g., arguments with spouse about consequences of intoxication, physical fights)
   4. tolerance, as defined by either of the following:
      a. a need for markedly increased amounts of the substance to achieve intoxication or desired effect
      b. markedly diminished effect with continued use of the same amount of the substance *(Note: Tolerance is not counted for those taking medications under medical supervision such as analgesics, antidepressants, ant-anxiety medications or beta-blockers.)*
   5. withdrawal, as manifested by either of the following:
      a. the characteristic withdrawal syndrome for the substance (refer to Criteria A and B of the criteria sets for Withdrawal from the specific substances)
      b. the same (or a closely related) substance is taken to relieve or avoid withdrawal symptoms *(Note: Withdrawal is not counted for those taking medications under medical supervision such as analgesics, antidepressants, anti-anxiety medications or beta-blockers.)*
   6. the substance is often taken in larger amounts or over a longer period than was intended
   7. there is a persistent desire or unsuccessful efforts to cut down or control substance use
   8. a great deal of time is spent in activities necessary to obtain the substance, use the substance, or recover from its effects
   9. important social, occupational, or recreational activities are given up or reduced because of substance use
   10. the substance use is continued despite knowledge of having a persistent or recurrent physical or psychological problem that is likely to have been caused or exacerbated by the substance
   11. Craving or a strong desire or urge to use a specific substance.

ANNEXE 2

Version française du questionnaire ASI (addiction severity index)

ADDICTION SEVERITY INDEX - TSR

Adaptation française

INSTRUCTIONS

1) Ne laissez aucun blanc et utilisez les codes appropriés

X : pas de réponse
N : non concerné
Utilisez un caractère par case

2) Les items entourés sont à poser en base et au suivi. Ces items sont à reformuler si précédés de *.

3) De l'espace libre est réservé après chaque section pour les commentaires

EVALUATION DE LA SEVERITE

L'évaluation de la sévérité est établie à travers un entretien qui permet d'estimer les besoins pour le patient d'un traitement supplémentaire dans chaque domaine. Les échelles s'étendent de 0 (pas du tout) à 9 (traitement absolument nécessaire, pronostic vital en jeu). Chaque évaluation est basée sur l'histoire symptomatologique du patient, les conditions actuelles et une évaluation subjective de son besoin d'être traité dans chaque domaine concerné.
Pour plus de renseignements se reporter au manuel.
Remarque : cette échelle de sévérité est optionnelle.

RAPPEL DE L'ECHELLE D'AUTO-EVALUATION

0 — non pas du tout
1 — légèrement
2 — modérément
3 — considérablement
4 — extrêmement

INFORMATIONS GENERALES

N° DOSSIER

Date de l'entrevue : jour mois année

Heure début :

Heure fin :

Catégorie :
1 – Base
2 – Suivi

Code contact :
1 – en personne
2 – téléphone

SEXE :
1 – Masculin
2 – Féminin

Code interviewer

SPECIAL :
1 – Patient sorti
2 – Refus du patient
3 – Patient incapable de répondre

NOM : ……..……..

ADRESSE : ……..
…….

CODE POSTAL

1- Depuis combien de temps vivez-vous à cette adresse ? ans mois

2- Est-ce que vous êtes propriétaire vous ou votre famille ?
0 – Non
1 – Oui

3- Date de naissance : jour mois année

6 – Au cours des 30 derniers jours, avez-vous été en environnement contrôlé ?
1 – NON
2 – Prison, garde à vue
4 – Traitement alcool ou drogue
5 – Traitement médical
6 – Traitement psychiatrique
7 – Autre : ……

7 – Combien de jours ?

Profil de sévérité

9									
8									
7									
6									
5									
4									
3									
2									
1									
0									
PROBLEMES	Médical	Emploi / Ressources	Alcool	Substances	Tabac	Aut. Add. Sans subst	Situation légale	Fam./Soc.	Psychologique

ETAT MEDICAL

*

1 - Combien de fois dans votre vie avez-vous été hospitalisé pour des problèmes médicaux ? (*Y compris surdosage et delirium tremens ; excepté désintoxication)* ☐☐

2 – Combien de temps s'est écoulé depuis votre dernière hospitalisation pour un problème physique ? ☐☐ ans ☐☐ mois

3 – Avez-vous un problème médical chronique qui continue de perturber votre vie (Sérologie hépatite et VIH) ? ☐
0 – Non 1 - Oui
Précisez : ……..

4 – Prenez-vous régulièrement un médicament prescrit pour un problème physique ? ☐
0 – Non 1 - Oui

5 – Recevez-vous une pension pour une incapacité physique ? (hors d'une incapacité psychiatrique) ☐
0 – Non 1 - Oui
Précisez : ……..

6 - Au cours des 30 derniers jours, combien de journées avez-vous éprouvé des problèmes médicaux ? ☐☐

Question 7 et 8 : demandez au patient d'utiliser l'échelle d'évaluation subjective

7 - Dans quelle mesure avez-vous été perturbé ou préoccupé par ces problèmes médicaux pendant les 30 derniers jours ? ☐

8 – Dans quelle mesure est-il important pour vous maintenant de recevoir un traitement pour ces problèmes médicaux ? ☐

Évaluation de sévérité par l'interviewer

9 – Comment évaluez-vous son besoin d'un traitement médical ? ☐

Évaluation de confiance

Les renseignements ci-dessus sont-ils considérablement déformés :

10 – volontairement par le patient ☐
0 – Non 1 – Oui

11 – par son incapacité à comprendre ☐
0 – Non 1 – Oui

COMMENTAIRES

3 – Sérologie hépatite et VIH ?

TSR – PROBLEMES DE SANTE

* Combien de fois	dans cet organisme	ailleurs
4. Avez-vous vu un médecin pour obtenir des soins ?	__|__	__|__
5. Avez-vous vu une infirmière ou un professionnel de la santé pour obtenir des soins ?	__|__	__|__
6. Avez-vous eu un échange significatif (important) au sujet de vos problèmes de santé :		
En consultation individuelle ?	__|__	__|__
En session de groupe ?	__|__	__|__

EMPLOI / RESSOURCES

* 1 - Nombre d'années d'études (BAC = 12 ans) ☐☐ ans ☐☐ mois

* 2 – Formation ou études techniques ☐☐ ans ☐☐ mois

3 – Avez-vous un métier, une profession, une compétence ?
0 – Non ☐
1 – Oui (préciser) : ……

4 – Avez-vous un permis de conduire valide ?
0 – Non 1 - Oui ☐

5 – Pouvez-vous disposer d'une automobile ? (sans permis de conduire valide répondez Non)
0 – Non 1 - Oui ☐

6 – Quelle a été la durée de votre plus long emploi plein temps ? ☐☐ mois ☐☐ ans

7 – Occupation actuelle ☐
(ou dernière occupation)
Précisez : ……..

8 – Quelqu'un contribue-t-il à vous supporter financièrement d'une manière ou d'une autre ?
0 – Non 1 - Oui ☐

9 – *(Si oui à la question 8)* Cela constitue-t-il la partie principale de vos ressources financières ?
0 – Non 1 - Oui ☐

10 – Type d'emploi habituel au cours des trois dernières années ☐

1 – Temps plein *(32 heures/semaine)*
2 – Temps partiel *(heures régulières)*
3 – Temps partiel *(heures irrégulières, travail à la journée)*
4 – Etudiant
5 – Service militaire
6 – Retraité / Invalidité
7 – Sans emploi
8 – Environnement contrôlé

11 – Combien de journées de travail avez-vous été payé au cours des 30 derniers jours *(y compris travail au noir)* ? ☐☐

Combien d'argent avez-vous reçu des sources suivantes au cours des 30 derniers jours ?

12 – Emploi *(revenu net)* ☐☐☐☐☐☐
13 – Chômage ☐☐☐☐☐☐
14 – Aide sociale ☐☐☐☐☐☐
15 – Pension ☐☐☐☐☐☐
16 – Conjoint, famille, amis ou gains ☐☐☐☐☐☐
17 – Illégal ☐☐☐☐☐☐

18 – Combien de personnes dépendent de vous pour la plus grande partie de leurs besoins ? *(nourriture, logement, etc)* ☐

19 – Combien de journées avez-vous éprouvé des problèmes d'emploi au cours des 30 derniers jours ? ☐☐

Question 20 et 21 : demandez au patient d'utiliser l'échelle d'évaluation subjective

20 – Dans quelle mesure avez-vous été perturbé ou préoccupé par ces problèmes d'emploi au cours des 30 derniers jours ? ☐

21 – Dans quelle mesure est-il important pour vous maintenant de recevoir un traitement pour ces problèmes d'emploi ? ☐

Évaluation de sévérité par l'interviewer

22 – Comment évaluez-vous son besoin en conseil professionnel ? ☐

Évaluation de confiance

Les renseignements ci-dessus sont-ils considérablement déformés :

23 – volontairement par le patient
0 – Non 1 – Oui ☐

24 – par son incapacité à comprendre
0 – Non 1 – Oui ☐

COMMENTAIRES

TSR – PROBLEMES D'EMPLOI ET DE RESSOURCES FINANCIERES

* Combien de fois	dans cet organisme	ailleurs
3. Avez-vous fait des démarches pour un emploi, des études ou une formation ?		
Directement auprès d'une ANPE ?	__|__	__|__
Par l'intermédiaire d'une autre personne	__|__	__|__
4. Avez-vous fait des démarches auprès de l'assurance-chômage, de l'aide sociale, ou d'un autre organisme de ce type :		
Directement auprès de cet organisme ?	__|__	__|__
Par l'intermédiaire d'un intervenant ou d'un thérapeute ?	__|__	__|__
5. Avez-vous eu un échange significatif (important) quant à vos problèmes d'emploi ou de ressources financières :		
En consultation individuelle ?	__|__	__|__
En session de groupe ?	__|__	__|__

Les items soulignés sont les items à poser en base et en suivi. Ces items sont à reformuler si précédés de *.

SUBSTANCES / ALCOOL / TABAC / AUTRES ADDICTIONS SANS SUBSTANCE

	30 derniers jours	Nb de prises par jour	Prescription 30 der jours	Toute la vie années	Voie
* 1- alcool toute utilisation					
* 2- alcool intox					
* 3- héroïne					
*4a- méthadone					
*4b- buprénorphine					
* 5- autres opiacés/ analgésiques					
* 6- barbituriques					
* 7- autres sédatifs/ hyp/tranq					
* 8- cocaïne					
* 9- amphétamines					
*10- cannabis					
*11- hallucinogènes					
*12- inhalants					
*13- plus d'une substance par jour					
*12b- tabac					

Voie d'administration: 1 = orale, 2 = nasale, 3= fumée, 4 = inj. non IV, 5 = IV
Prescription : 0 = non ; 1 = oui

*12c- Autre addiction sans substance posant problème :_____ (précisez)
0= non ; 1= oui

Si oui, 30 derniers jours

Toute la vie (en années)

14- Quelle(s) substance(s) pose(nt) le problème principal ?
(Veuillez coder comme précédemment ou : 15-polysubstances; 17-tabac ; 19 :autre addiction sans substance)

Si 04, préciser si cette substance est M= Méthadone, B= Buprénorphine

Si plusieurs substances, veuillez entourer les substances déclarées comme problématiques

1	2	3	4a	4b	5	6	7	8	9	10	11	12	12b	12c

15- Quelle a été la durée de votre dernière période d'abstinence volontaire de cette (ces) substance(s) principale(s) ou d'une autre addiction sans substance
- en mois - (00-jamais abstinent)

16- Depuis combien de mois, cette abstinence a-t-elle cessé ?
(00- encore abstinent)

***17-** Combien de fois avez-vous eu :

- un delirium tremens (alcool) | | |
- une overdose (drogue) | | |

***18-** Combien de fois dans votre vie avez-vous été traité pour :

- problème d'alcool | | |
- problème de substance (hors alcool et tabac) | | |
- problème de tabac | | |
- autre addiction sans substance | | |

***19-** Parmi ces traitements, combien étaient des cures de sevrage (désintoxication) seulement pour:

- problème d'alcool | | |
- problème de substance (hors alcool et tabac) | | |
- problème de tabac | | |
- autre addiction sans substance | | |

20- Au cours des 30 derniers jours, combien d'argent estimez-vous avoir dépensé pour :

- alcool | | | | | | |
- substances (hors alcool et tabac) | | | | | | |
- tabac | | | | | | |
- autre addiction sans substance | | | | | | |

21- Combien de journées avez-vous été traité en externe pour des problèmes d'alcool, de substances, de tabac ou pour une autre addiction sans substance au cours des 30 derniers jours ? (y compris AA, NA) | | |

22- Au cours des 30 derniers jours, combien de journées avez-vous éprouvé des :

- problèmes d'alcool | | |
- problèmes de substances (hors alcool et tabac) | | |
- problèmes de tabac | | |
- autre addiction sans substance | | |

Question 23 et 24 : demander au bénéficiaire d'utiliser l'échelle d'évaluation subjective *:*

23- Au cours des 30 derniers jours, dans quelle mesure avez-vous été perturbé ou préoccupé par des :

- problèmes d'alcool |
- problèmes de substances (hors alcool et tabac) |
- problèmes de tabac |
- autre addiction sans substance |

24- Dans quelle mesure est-il important pour vous maintenant de recevoir un traitement pour ces:

- problèmes d'alcool
- problèmes de substances (hors alcool et tabac)
- problèmes de tabac
- autre addiction sans substance

Evaluation de sévérité par l'interviewer

25b- Selon vous, quelle(s) substances pose(nt) le problème principal? (Entourez le(s) numéros correspondant)

1	2	3	4a	4b	5	6	7	8	9	10	11	12	12b	12c

25- Comment évaluez-vous son besoin de traitement pour :

- problème d'alcool
- problème de substances (hors alcool et tabac)
- problème de tabac
- autre addiction sans substance

Evaluation de confiance

Les renseignements ci-dessus sont-ils considérablement déformés :

26- Volontairement par le patient
0- Non
1- Oui

27- Par son incapacité à comprendre
0- Non
1- Oui

TSR – PROBLEMES LIES AUX DROGUES

* Combien de fois	dans cet organisme	ailleurs
7. Avez-vous participé à une séance d'information ou d'éducation sur les drogues ?	__|__	__|__
8. Avez-vous participé à une réunion de type NA ou CA ?	__|__	__|__
9. Avez-vous participé à une séance de prévention de la rechute ?	__|__	__|__
10. Avez-vous eu un échange significatif (important) au sujet de vos problèmes liés à la drogue :		
En consultation individuelle ?	__|__	__|__
En session de groupe ?	__|__	__|__

TSR – PROBLEMES LIES A L'ALCOOL

* Combien de fois	dans cet organisme	ailleurs
7. Avez-vous participé à une séance d'information ou d'éducation sur l'alcool ?	__|__	__|__
8. Avez-vous participé à une réunion de type AA ou Programme 12 étapes ?	__|__	__|__
9. Avez-vous participé à une séance de prévention de la rechute ?	__|__	__|__
10. Avez-vous eu un échange significatif (important) au sujet de vos problèmes liés à l'alcool :		
En consultation individuelle ?	__|__	__|__
En session de groupe ?	__|__	__|__

SITUATION LEGALE

1 – Cette admission a-t-elle été provoquée ou suggérée par le système judiciaire *(juge, policier, etc)* ?
0 – Non 1 – Oui ☐

2 – Etes-vous en période de probation, de liberté conditionnelle ou dans un établissement pénal ?
0 – Non 1 – Oui ☐

Combien de fois dans votre vie avez-vous été arrêté et inculpé des délits et crimes suivants :

* 3 – Vol à l'étalage, vandalisme ☐☐
* 4 – Résistance à l'autorité (violation de probation) ☐☐
* 5 – Usage et trafic de stupéfiants ☐☐
* 6 – Escroquerie, faux et usage de faux ☐☐
* 7 – Arme et explosif ☐☐
* 8 – Vol avec effraction (cambriolage) ☐☐
* 9 – Vol à main armée ☐☐
* 10 – Agression ☐☐
* 11 – Incendiaire ☐☐
* 12 – Viol ☐☐
* 13 – Homicide, meutre ☐☐
* 14 A – Prostitution ☐☐
* 14 B – Outrage à magistrat ☐☐
* 14 C – Autre (préciser) : …… ☐☐

* 15 – Combien de ces inculpations ont entraîné une condamnation ? ☐☐

Combien de fois dans votre vie avez-vous fait l'objet d'une des inculpations suivantes ?

* 16 – Désordre, vagabondage, ivresse publique. ☐☐
* 17 – Conduite en état d'ivresse *(ou sous l'effet d'une substance)* ☐☐
* 18 – Autre infraction majeure au code de la route (conduite dangereuse, excès de vitesse, défaut de permis, etc.) ☐☐
* 19 – Combien de mois avez-vous été détenus dans votre vie ? ☐☐

20 – Combien de temps a duré votre dernière détention ? ☐☐

21 – Pour quelle raison étiez-vous détenu ? (7-20 et 22-24, en cas d'inculpations multiples, codez la plus grave) ☐☐

22 – Etes-vous en instance d'inculpation de procès ou d'une sentence ?
0 – Non 1 – Oui ☐

23 – Pour quel motif ? (Si plusieurs motifs, codez le plus grave) ☐☐

24 – Au cours de 30 derniers jours, combien de journées avez-vous été détenu ? ☐☐

25 – Au cours de 30 derniers jours, combien de journées avez-vous eu des activités illégales ? ☐☐

Question 26 et 27 : demandez au patient d'utiliser l'échelle d'évaluation subjective

26 – Dans quelle mesure pensez-vous que vos problèmes légaux actuels sont graves ? (exclure les problèmes civils) ☐

27 – Dans quelle mesure est-il important pour vous maintenant d'avoir de l'aide ou une consultation pour ces problèmes légaux ? ☐

Évaluation de sévérité par l'interviewer

28 – Comment évaluez-vous son besoin de conseil juridique ? ☐

Évaluation de confiance

Les renseignements ci-dessus sont-ils considérablement déformés :

29 – volontairement par le patient
0 – Non 1 – Oui ☐

30 – par son incapacité à comprendre
0 – Non 1 – Oui ☐

COMMENTAIRES

TSR – PROBLEMES JUDICIAIRES

* Combien de fois	dans cet organisme	ailleurs
3. A-t-on (soit vous, soit un organisme) pris contact avec une instance judiciaire (tribunaux, services de détention, de probation ou de libération conditionnelle) par rapport à vos problèmes judiciaires ?	__|__	__|__
4. Avez-vous eu un échange significatif (important) au sujet de vos problèmes judiciaires :		
En consultation individuelle ?	__|__	__|__
En session de groupe ?	__|__	__|__

HISTOIRE DE LA FAMILLE

Certaines personnes de votre famille, ont-elles ou ont-elles eu des difficultés que vous qualifieriez d'alcoolisme, de toxicomanie ou psychologiques, qui ont ou auraient dû nécessiter un traitement ?

Côté Maternel

	Alc	Drog	Psych
Gd Mère	☐	☐	☐
Gd Père	☐	☐	☐
Mère	☐	☐	☐
Tante	☐	☐	☐
Oncle	☐	☐	☐

Côté Paternel

	Alc	Drog	Psych
Gd Mère	☐	☐	☐
Gd Père	☐	☐	☐
Père	☐	☐	☐
Tante	☐	☐	☐
Oncle	☐	☐	☐

Fratrie

	Alc	Drog	Psych
Frère 1	☐	☐	☐
Frère 2	☐	☐	☐
Sœur 1	☐	☐	☐
Sœur 2	☐	☐	☐

Consigne : Noter « 0 » dans la catégorie famillale quand la réponse est clairement négative pour toute les personnes de cette catégorie ; « 1 » quand la réponse est clairement oui pour un membre de la catégorie familiale ; « X » lorsque la réponse est incertaine ou « je ne sais pas » et « N » lorsque le patient n'a jamais eu personne de ce dégrés de parenté. Coder le parent le plus gravement atteint en cas de plusieurs individus pour une catégorie

TSR – PROBLEMES FAMILLIAUX

* Combien de fois	dans cet organisme	ailleurs
3. Avez-vous eu un échange significatif (important) au sujet de vos problèmes familiaux en présence de votre famille :		
Avec un thérapeute familial ?	__|__	__|__
Avec un intervenant ou un autre thérapeute ?	__|__	__|__
4. Avez-vous eu un échange significatif (important) au sujet de vos problèmes familiaux en l'absence de votre famille :		
Avec un thérapeute familial ?	__|__	__|__
Avec un intervenant ou un autre thérapeute ?	__|__	__|__

RELATIONS FAMILIALES ET SOCIALES

* 1 – Etat civil :
1 – Marié 4 – Séparé
2 – Remarié 5 – Divorcé
3 –Veuf 6 – Célibataire

2 – Depuis combien de temps avez-vous cet état civil ? ans mois
(Depuis l'âge de 18 ans si vous n'avez jamais été marié)

3 – Etes-vous satisfait de cette situation ?
0 – Non
1 – Indifférent
2 – Oui

* 4 – Conditions de vie habituelles der 3 ans
1 – avec conjoint et enfants
2 – avec conjoint seulement
3 – avec enfants seulement
4 – avec parents
5 – avec famille
6 – avec amis
7 – seul
8 – environnement contrôlé
9 – pas de conditions de vie stables

5 – Depuis combien de temps vivez-vous dans ces conditions ? ans mois
(Depuis l'âge de 18 ans si vous vivez avec vos parents ou votre famille)

6 – Etes-vous satisfait de ces conditions de vie ?
0 – Non 1 – Oui

Est-ce que vous vivez avec quelqu'un qui a couramment des :
0 – Non 1 – Oui
6 A problèmes d'alcool ?
6 B problèmes de substances non prescrites ?

7 – Avec qui passez-vous la plupart de votre temps libre ?
1 – famille
2 – amis
3 – seul(e)

8 – Êtes-vous satisfait de cette façon de passer votre temps libre ?
0 – Non
1 – Indifférent
2 – Oui

9 – Combien d'amis intimes avez-vous ?

Consignes pour 9A à 18 :
Noter « 0 » dans la case correspondante quand la réponse est clairement négative pour toutes les personnes de cette catégorie ; « 1 » quand la réponse est clairement Oui pour un membre de la catégorie familiale ; « X » lorsque la réponse est incertaine ou « je ne sais pas » et « N » lorsque le patient n'a jamais eu personne de ce degrés de parenté.

9A Pourriez-vous dire que, dans votre vie, vous avez eu des relations étroites durant de longues périodes avec des personnes de votre entourage proche ?
0 – Non 1 – Oui
Mère
Père
Frère/sœur
Epouse/partenaire sexuel(le)
Enfants
Amis

Avez-vous eu des périodes importantes pendant lesquelles vous avez éprouvé de graves problèmes avec :
0 – Non 1 – Oui

	30 der jours	dans toute la vie
10 – Mère		
11 – Père		
12 – Frère/sœur		
13 – Epouse/partenaire sexuel(le)		
14 – Enfants		
15 – Autre parent important à vos yeux : ……..		
16 – Amis intimes		
17 – Voisins		
18 – Camarades de travail		

Est-ce que certaines de ces personnes (10-18) ont abusé de vous :
0 – Non 1 – Oui
18 A – Emotionnellement (en vous mettant à bout avec des mots très durs)
18 B – Physiquement (en vous causant des préjudices corporels)
18 C – Sexuellement (en vous forçant à subir des avances ou des actes sexuels)

19 – Au cours de 30 derniers jours, combien de journées avez-vous été en conflit grave ?
Avec votre famille
Avec d'autres personnes (famille exclue)

Question 20 et 23 : demandez au patient d'utiliser l'échelle d'évaluation subjective

Dans quelle mesure avez-vous été perturbé ou préoccupé au cours des 30 derniers jours par ces :
20 – Problèmes familiaux
21 – Problèmes sociaux

Dans quelle mesure est-il important pour vous maintenant de recevoir un traitement ou de l'aide pour ces :
22 – Problèmes familiaux
23 – Problèmes sociaux

Évaluation de sévérité par l'interviewer

24 – Comment évaluez-vous son besoin en conseil familial ou aide sociale ?

Évaluation de confiance

Les renseignements ci-dessus sont-ils considérablement déformés :

25 – volontairement par le patient
0 – Non 1 – Oui

26 – par son incapacité à comprendre
0 – Non 1 – Oui

COMMENTAIRES

ETAT PSYCHOLOGIQUE

* (1) – Combien de fois avez-vous été traité pour des problèmes psychologiques ou émotionnels :

Dans un hôpital ☐☐
En externe ou dans le privé ☐☐

(2) – Recevez-vous une pension pour une incapacité psychiatrique ?
0 – Non 1 – Oui ☐

Avez-vous eu une période importante (ne résultant pas de la consommation de substances) au cours de laquelle vous avez :
0 – Non 1 – Oui

	30 derniers jours	dans toute la vie
(3) – Eu une dépression grave	☐	☐
(4) – Souffert d'une anxiété ou d'une tension grave	☐	☐
(5) – Connu des hallucinations	☐	☐
(6) – Eu des difficultés à comprendre, à vous concentrer ou à vous souvenir	☐	☐
(7) – Eprouvé des difficultés à réprimer un comportement violent	☐	☐
(8) – Eu des sérieuses idées de suicide	☐	☐
(9) – Tenté de vous suicider	☐	☐
(10) – Un médicament prescrit pour un problème psychologique ou émotionnel ?	☐	☐

(11) – Au cours des 30 derniers jours, combien de journées avez-vous éprouvé ces problèmes psychologiques ou émotionnels ? ☐☐

Question 12 et 13 : demandez au patient d'utiliser l'échelle d'évaluation subjective

(12) – Au cours des 30 derniers jours dans quelle mesure avez-vous été perturbé ou préoccupé par ces problèmes psychologiques ou émotionnels ? ☐

(13) – Dans quelle mesure est-il important pour vous maintenant de recevoir un traitement ou de l'aide pour ces problèmes psychologiques ou émotionnels ? ☐

Les items suivants sont à compléter par l'interviewer

Au moment de l'entretien, le patient est :
0 – Non 1 – Oui

(14) – Manifestement déprimé/renfermé ☐
(15) – Manifestement hostile ☐
(16) – Manifestement anxieux/nerveux ☐
(17) – Le patient à des difficultés à évaluer objectivement la situation, il a des troubles de l'idéation, déni ☐
(18) – Il a des difficultés à comprendre, à se concentrer, à se souvenir ☐
(19) – Il a des pensées suicidaires ☐

Évaluation de sévérité par l'interviewer

(20) – Comment évaluez-vous son besoin d'un traitement psychiatrique/psychologique ? ☐

Évaluation de confiance

Les renseignements ci-dessus sont-ils considérablement déformés :

(21) – volontairement par le patient
0 – Non 1 – Oui ☐

(22) – par son incapacité à comprendre
0 – Non 1 – Oui ☐

COMMENTAIRES

TSR – PROBLEMES EMOTIONNELS OU PSYCHOLOGIQUES

* Combien de fois	dans cet organisme	ailleurs
5. Avez-vous en consultation, pratiqué un forme de relaxation de biofeedback ou de méditation :		
En présence d'un professionnel spécialisé dans ce domaine ?	_|_	_|_
En présence d'un intervenant ou d'un thérapeute ?	_|_	_|_
6. Avez-vous en consultation pris part à un jeu de rôles à un psychodrame, à un sociodrame ou à toute autre méthode de modification du comportement :		
En présence d'un professionnel spécialisé dans ce domaine ?	_|_	_|_
En présence d'un intervenant ou d'un thérapeute ?	_|_	_|_
7. Avez-vous eu un échange significatif (important) au sujet de vos problèmes psychologiques ou émotionnels :		
Avec un psychothérapeute ?	_|_	_|_
Avec un intervenant ou un autre thérapeute	|	|

ANNEXE 3

Définition de la dépression selon la classification internationale des maladies (CIM-10)

F32 Episodes dépressifs

Dans les épisodes typiques de chacun des trois degrés de dépression: léger, moyen ou sévère, le sujet présente un abaissement de l'humeur, une réduction de l'énergie et une diminution de l'activité. Il existe une altération de la capacité à éprouver du plaisir, une perte d'intérêt, une diminution de l'aptitude à se concentrer, associées couramment à une fatigue importante, même après un effort minime. On observe habituellement des troubles du sommeil, et une diminution de l'appétit. Il existe presque toujours une diminution de l'estime de soi et de la confiance en soi et, fréquemment, des idées de culpabilité ou de dévalorisation, même dans les formes légères. L'humeur dépressive ne varie guère d'un jour à l'autre ou selon les circonstances, et peut s'accompagner de symptômes dits "somatiques", par exemple d'une perte d'intérêt ou de plaisir, d'un réveil matinal précoce, plusieurs heures avant l'heure habituelle, d'une aggravation matinale de la dépression, d'un ralentissement psychomoteur important, d'une agitation, d'une perte d'appétit, d'une perte de poids et d'une perte de la libido. Le nombre et la sévérité des symptômes permettent de déterminer trois degrés de sévérité d'un épisode dépressif: léger, moyen et sévère.

ANNEXE 4

Médicaments antidépresseurs commercialisés en France dans le traitement des épisodes dépressifs

Imipraminiques : clomipramine (Anafranil®), amoxapine (Défanyl®), amitriptyline (Elavil®, Laroxyl®), maprotiline (Ludiomil®), dosulépine (Prothiaden®), doxépine (Quitaxon®), trimipramine (Surmontil®), imipramine (Tofranil®).

Inihibiteurs spécifiques de la recapture de la sérotonine (ISRS) : citalopram (Séropram®), escitalopram (Séroplex®), fluoxétine (Prozac®), fluvoxamine (Floxyfral®), paroxétine (Deroxat®), sertraline (Zoloft®).

Inhibiteurs de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline (IRSN) : milnacipran (Ixel®), venlafaxine (Effexor®), duloxétine (Cymbalta®, *non commercialisé en France*).

Inibiteurs de la monoamine oxydase (IMAO) non sélectifs : iproniazide (Marsilid®) ; IMAO sélectifs A : moclobémide (Moclamine®).

Autres antidépresseurs : miansérine (Athymil®), mirtazapine (Norset®), tianeptine (Stablon®).

ANNEXE 5

ARTICLE 5

Cholecystokinin knock-down in the basolateral amygdala has anxiolytic and antidepressant-like effects in mice.

Del-Boca C, Lutz PE, Le Merrer J, Koebel P, Kieffer BL.

Neuroscience (2012) 218:185-195

Neuroscience 218 (2012) 185–195

CHOLECYSTOKININ KNOCK-DOWN IN THE BASOLATERAL AMYGDALA HAS ANXIOLYTIC AND ANTIDEPRESSANT-LIKE EFFECTS IN MICE

C. DEL BOCA, P. E. LUTZ, J. LE MERRER, P. KOEBEL AND B. L. KIEFFER*

Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Centre National de Recherche Scientifique/Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale/Université de Strasbourg, Illkirch-Graffenstaden, France

Abstract—Cholecystokinin (CCK) is a neuropeptide widely distributed in the mammalian brain. This peptide regulates many physiological functions and behaviors, such as cardio-respiratory control, thermoregulation, nociception, feeding, memory processes and motivational responses, and plays a prominent role in emotional responses including anxiety and depression. CCK-expressing brain regions involved in these functions remain unclear and their identification represents an important step towards understanding CCK function in the brain. The basolateral amygdala (BLA) is strongly involved in emotional processing and expresses high levels of CCK. In this study we examined the contribution of CCK expressed in this brain region to emotional responses in mice. To knockdown CCK specifically in the BLA, we used stereotaxic delivery of recombinant adeno-associated viral vectors expressing a CCK-targeted shRNA. This procedure efficiently reduced CCK levels locally. shCCK-treated animals showed reduced levels of anxiety in the elevated plus-maze, and lower despair-like behavior in the forced swim test. Our data demonstrate that CCK expressed in the BLA represents a key brain substrate for anxiogenic and depressant effects of the peptide. The study also suggests that elevated amygdalar CCK could contribute to panic and major depressive disorders that have been associated with CCK dysfunction in humans. **© 2012 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.**

Key words: cholecystokinin, baso-lateral amygdala, depression, anxiety, adeno-associated viral vector, short-hairpin RNA.

INTRODUCTION

Cholecystokinin (CCK), first identified as a gastrointestinal hormone (Mutt and Jorpes, 1968), is also highly expressed within the brain (Meziane et al., 1997). Neural CCK has been implicated in a wide range of physiological processes such as emotional and motivational states, thermoregulation, nociception and cognition (Beinfeld, 2001). Pre-pro-CCK is cleaved in smaller biologically active fragments acting as neuromodulatory peptides (Rotzinger et al., 2010). CCK peptides activate two closely related G-protein coupled receptors, CCK_1 (CCK_1-R) and CCK_2 (CCK_2-R), the latter being predominant in the brain (Noble et al., 1999).

In human, high levels of CCK have been associated with motivational loss and panic disorders (Hebb et al., 2005), and a role for CCK has been proposed in the induction of anxiety and depression (Shindo and Yoshioka, 2005; Berna et al., 2007), with CCK_2-R being the main effector of CCK anxiogenic properties (Bradwejn and Koszycki, 2001; Eser et al., 2011). In rodents, CCK_2-R agonists increase levels of anxiety-like responses in several behavioral paradigms (Rotzinger et al., 2010), while conversely systemic CCK_2-R antagonists attenuate stress-induced anxiety-like behavior (Wang et al., 2011). In addition, CCK_2-R antagonists show antidepressant-like properties: systemic injection of a CCK_2-R antagonist decreased behavioral despair in the forced swim test, and this effect was synergistic with the activity of the enkephalinase inhibitor RB101 (Hernando et al., 1996). Furthermore, chronic blockade of CCK_2-R normalized hypothalamic–pituitary–adrenal axis hyperactivity and normalized the increase in despair-like behavior elicited by repeated social defeat (Becker et al., 2008). Concordant with pharmacological studies, genetic approaches (Noble and Roques, 2002) reveal that CCK_2-R knock-out (KO) mice display decreased levels of anxiety (Raud et al., 2005). Moreover, transgenic mice over-expressing CCK_2-R showed increased anxiety, as well as prolonged HPA axis activity following acute stress (Chen et al., 2010). Finally, antagonistic interactions between CCK and opioid systems have been established in the modulation and expression of stress-related behaviors, opposing memory-enhancing and anxiogenic effects of CCK to amnesic and anxiolytic effects of opioid peptides (Hebb et al., 2005). These data also implicate CCK in reward, motivation and addictive behaviors (Lu et al., 2002; Pommier et al., 2002; Mitchell et al., 2006).

CCK and CCK-Rs are widely distributed throughout the rodent brain and may modulate emotional behaviors at

*Corresponding author. Address: IGBMC, Parc d'innovation 1 rue Laurent Fries, BP 10142, 67404 Illkirch Cedex, France. Tel: +33-(0)8-65-56-93; fax: +33-(0)8-65-56-04.
E-mail address: briki@igbmc.fr (B. L. Kieffer).

Abbreviations: ANOVA, analysis of variance; BCIP, bromo-chloro-indolyphosphate; BLA, basolateral amygdalaCCK, Cholecystokini; CPA, conditioned place aversion; EPM, elevated plus-maze; FST, forced swim test; ISH, *in situ* hybridization; KO, knock-out; LD, light/dark box; NBT, Nitroblue tetrazolium; OF, open field; PBS, phosphate buffered saline; RSA, retrosplenial agranular cortex; RT, room temperature; shRNA, short-hairpin RNA; TS, tail suspension test.

0306-4522/12 $36.00 © 2012 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.05.022

several brain sites, notably in olfactory bulb, cerebral cortex, hippocampus, amygdala, thalamus and ventral tegmental area (Meziane et al., 1997; Cain et al., 2003). The amygdalar complex is implicated in the generation of emotional states, stress coding and associative learning (LeDoux, 2000), as well as retrieval of aversive memories (Frenois et al., 2005). In rat, local pharmacological studies have suggested a role for CCK_2-R in the basolateral amygdala (BLA) in anxiogenic effects of CCK (Belcheva et al., 1994; Frankland et al., 1997). To our knowledge however, the role of CCK expressed in the BLA has not been investigated by genetic approaches. In the present study, we used a siRNA-based strategy to locally knock-down CCK. We injected in the BLA a recombinant viral vector encoding a short hairpin RNA (shRNA) targeting CCK and then examined behavioral consequences on emotional responses.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

AAV_2 viral vectors construction

A shRNA was designed to target the m*cck* gene (5′-TC AGTGACTCCCAGACCTAATGTT-3′). Recombinant adeno-associated virus serotype 2 (AAV_2)-shCCK viral vectors were generated expressing enhanced green flourescent protein (eGFP) and shCCK (AAV_2-shCCK) under the control of CMV and mU6 promoters respectively. Control vectors encode either for eGFP alone (AAV_2-eGFP) or for eGFP and a scramble shRNA (AAV_2-shScramble). The shScramble sequence selected (5′-GTTGGCTCCTAGCAGATCCTA-3′) has no match *in silico* in the mouse genome. AAV_2 vectors were generated by triple transfection of AAV-293 cell line (Stratagene) using (i) either pAAV-eGFP, pAAV-eGFP-shScramble or pAAV-eGFP-shCCK, (ii) pAAV-RC (Stratagene) containing *rep* and *cap* genes of the AAV_2 and (iii) pHelper (Stratagene) encoding for the adenoviral helping functions. Following 2 days cells were collected, lysed and treated with Benzonase (50 U/ml, sigma, 30 nm, 37 °C). Viral vectors were purified by iodixanol gradient ultracentrifugation (Zolotukhin et al., 2002) followed by dialysis and concentration against Dulbecco phosphate buffered saline (PBS) using centrifugal filters (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices 50 K). Viral particles were quantified by real time PCR using a plasmid standard pAAV-eGFP. To achieve comparable working concentrations, viruses were diluted in Dulbecco-PBS buffer to a final concentration of 3×10^{11} viral genomes *per* ml (vg/ml) and finally stored at −80 °C until use.

Behavioral experiments

Animals. Male C57BL/6J mice provided by Charles River (Lyon, France) were used for all the experiments. Mice were aged 8 weeks at the beginning of the experiments and housed 3–4 *per* cage in a 12 h dark/light cycle (light from 7 am to 7 pm), under controlled conditions of temperature and humidity. Food and water were available *ad libitum*. Experimental procedures were conducted in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and approved by the local ethical committee (Comité Régional d'éthique en matière d'expérimentation animale de Strasbourg, CREMEAS, 2003-10-08-[1]-58).

Drugs. For surgery mice were anaesthetized using ketamine/xylazine (Virbac/Bayer, 100/10 mg/kg). Morphine hydrochloride (Francopia), naloxone hydrochloride (a non-specific opioid antagonist, Sigma) and anesthetics were dissolved in sterile isotonic saline (NaCl 0.9%). All the doses refer to salt weight and were administered in a volume of 10 ml/kg.

Experimental procedure. Experiment 1. 12 naïve mice were unilaterally injected into the BLA with either AAV_2-shCCK ($n = 6$) or AAV_2-eGFP ($n = 6$) viral vectors. To qualitatively assess their silencing activity, we performed *in situ* hybridization (ISH) using Dig-labeled CCK-cRNA probes. To confirm the stability of CCK knock-down over time, Dig-ISH was performed either 2 or 6 weeks following surgery ($n = 3$ mice/time point/viral vector).

Experiment 2. 56 mice (2 independent cohorts) were bilaterally injected into the BLA with either AAV_2-shCCK or AAV_2-shScramble vectors (Cohort 1, $n = 16$ mice/group; Cohort 2, $n = 12$ mice/group) and 5 weeks later analyzed for emotional responses. Animals from the second cohort were processed only throughout tests for which an effect was observed in the first cohort. Twenty-four hours after the last behavioral experiment, all mice were sacrificed and brains analyzed for injection accuracy and viral spread. Finally, we used Dig-ISH to qualitatively confirm the pattern of down-regulation ($n = 3$ mice/condition) and [^{35}S]-ISH to quantify the intensity of CCK knock-down in both shCCK- and shScramble-injected mice ($n = 5$ mice/condition).

Surgery and virus delivery. Anesthetized mice were placed in a stereotaxic frame (Unimécanique, France). The skull was exposed and incisor bar adjusted such that bregma and lambda were at the same height. Stereotaxic injections were performed according to the Mouse Brain Atlas (Paxinos and Franklin, 2001). To this aim, a 5 µl microsyringe (SGE Analytical Science, Australia) was mounted to a micro-drive pump (Harvard apparatus, France) and connected by a PE-10 polyethylene tubing (Harvard apparatus, France) to a stainless-steel injector needle (0.47 mm external diameter). 1.5 µl of purified AAV_2 viral vectors were delivered into the BLA uni- or bilaterally in experiment 1 and 2, respectively. Injection speed was 0.1 µl/min, and the needle was slowly withdrawn 10 min after delivery. Following surgery, mice were single housed for 48 h to recover and then placed back in their original home cages.

Behavioral testing. We evaluated the effects of local CCK knock-down in four categories of behaviors: anxiety-like behavior, despair-like behavior, aversive place conditioning, and withdrawal syndrome, starting 5 weeks after surgery. The design of the behavioral test battery (see Fig. 1) was adapted from previous reports (McIlwain et al., 2001; Duangdao et al., 2009) and tests were ordered from less to most stressful as follows: elevated plus-maze (EPM), open field (OF), light/dark box (LD), forced swim (FST), tail suspension tests (TS), naloxone-induced conditioned place aversion (CPA), and naloxone-precipitated withdrawal. Elevated plus-maze was placed at the beginning of the battery as recommended by Voikar et al. (2004). The inter-test intervals were selected to allow the mice to fully recover between tests. A 3-days interval was chosen between tests of the same category, a 5-days interval separate anxiety from despair behaviors, and 7-days intervals were placed before and after the naloxone-induced CPA. All behavioral tests were performed between 8am and 1 pm.

Elevated plus-maze. The EPM was a plus-shaped maze elevated 52 cm from base, with black Plexiglas floor, consisting of two open and two closed arms (37 × 6 cm each) connected by a central platform (6 × 6 cm). The experiments were conducted under low-intensity light (10 lux). Movement and location of the mice were analyzed by an automated tracking system (Videotrack; View Point, Lyon, France). Each mouse was placed on the central platform facing a closed arm and observed for 5 min. Anxiety-like behavior was assessed by measures of the time spent and number of entries in closed and open arms of the maze, and related time and activity ratios (time spent or number of entries in open arms/total time spent or number of entries in arms). Risk-taking behavior was evaluated by the percentage of time spent in the distal part of the open arms (time spent in the last 1/3 of the open arm/total time in arms) and the number

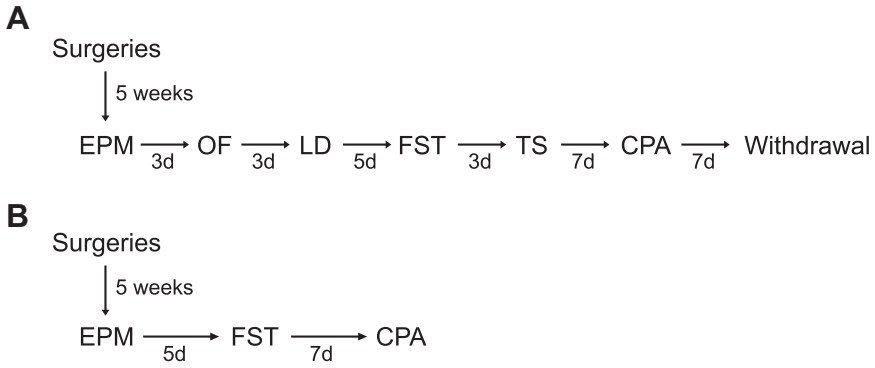


Fig. 1. Behavioral testing protocol to evaluate effects of CCK knock-down in the mouse BLA using two independent mouse cohorts. (A) Cohort 1. (B) Cohort 2. *Abbreviations:* EPM, elevated plus-maze; OF, open field; LD, light/dark box; FST, forced swim test; CPA, naloxone induced-conditioned place aversion; Naloxone precipitated-Withdrawal; d, days.

of head dips (total number of head dips and head dips from the distal part of the open arms). Finally, the distance traveled in the maze was used as measures of locomotor activity.

Open field. The apparatus consisted of four equal square arenas (50 × 50 cm) separated by 35 cm-high opaque grey Plexiglas walls. Light intensity of the room was set at 50 lux. The movement and location of the mice were analyzed by an automated tracking system (Videotrack; View Point, Lyon, France). Each mouse was introduced in an arena facing a corner and recorded for 30 min. The following parameters were measured to assess anxiety levels: percentage of time spent in a central zone (12 × 12 cm from the outer edge) and episodes of complete immobility. Total distance traveled and number of rearing and grooming episodes were used as measures of general activity.

Light/dark box. The apparatus consisted of two compartments (Panlab, Barcelona, Spain) connected through an open door located in the middle of a dividing wall. The light compartment (25 × 25 × 27 cm) consisted of white Plexiglas walls and floor, and was brightly illuminated by a white lamp (1500 lux). The dark compartment (25 × 16 × 27 cm) consisted of black Plexiglas walls and floor, and was illuminated by a red lamp (35 lux). Each mouse was placed in the dark compartment facing the wall opposite to the door and observed for 5 min. Total time spent in each compartment, latency to first entry and number of entries in the light compartment were recorded as anxiety parameters.

Forced swim test. Mice were individually placed for 6 min in a 5-liter beaker containing 3 l of water. Total duration of immobility, climbing and swimming episodes were scored in 2-min bins and results were expressed as percentage of total time. Latency to first immobility episode was also quoted. Each mouse was judged immobile when it ceased struggling and remained floating motionless in the water, making only the necessary movements to keep its head above water. Experimental conditions slightly differed between the two cohorts of experimental animals. For the first cohort, light intensity of the experimental room was set at 30 lux and temperature of water at 19 °C. For the second cohort, light intensity was set at 20 lux and temperature of water at 22 °C; moreover, the experiment was repeated on the next day.

Tail suspension. This test was carried out in an automated device (MED associates Inc, St Albans, VT) consisting of 6 black boxes (14 × 14 × 25 cm). Mice were suspended 4 cm above the floor by an adhesive tape placed approximately 1 cm from the tip of the tail. Total duration of immobility was monitored during a 6-min test session. An upper and a lower threshold defined struggling (active) and immobility (passive) behaviors, respectively. The latency to the first episode of immobility was also quoted.

Naloxone-induced conditioned place aversion. Place conditioning experiments were performed in unbiased computerized boxes (Imetronic, Pessac, France) formed by two Plexiglas chambers (15.5 × 16.5 cm) separated by a central alley (6 × 16.5 cm). Compartments differed in floor texture and wall shapes. Dim light (30 lux) was used in the room to minimize levels of anxiety. On day 1, mice were allowed to freely explore the apparatus for 15 min. The drug-paired chambers were assigned in such way that saline and naloxone groups were counterbalanced and unbiased toward contextual cues. Conditioning phase lasted 3 days. On days 2, 3 and 4 (8.30 am) all mice received a subcutaneous (s.c.) injection of saline and were confined to the vehicle-paired chamber for 30 min. On the same days (4 h later, 12:30 pm), mice received an injection of either naloxone (1 mg/kg s.c.) or saline and were confined to the drug-paired chamber for 30 min. The testing phase was conducted on day 5. Mice were placed in the neutral central alley and allowed to explore the apparatus for 15 min. Time spent in each chamber was recorded. Results were expressed as the percentage of time spent in the drug-paired compartment [% time spent in the drug-paired compartment = (time spent in the drug-paired compartment)/(time spent in both compartments) × 100].

Naloxone precipitated-withdrawal. shCCK and shScramble injected mice were daily injected (8.00 am) with either morphine (30 mg/kg i.p.) or saline during 7 days. On day 7, all mice received a naloxone injection (1 mg/kg s.c.) 2 h after the last morphine/saline administration. Each mouse was immediately placed into a Plexiglas transparent box (15 × 15 × 30 cm) and observed individually during 20 min for signs of withdrawal (Matthes et al., 1996; Frenois et al., 2002). Numbers of jumps, front paw tremors, scratches, rearings, groomings, and genital lick episodes were counted. Body tremor, ptosis, mastication, and piloerection were scored 1 for appearance or 0 for nonappearance within 5 min bins. Locomotor activity over 5 min periods was rated from 0 for inactivity to 2 for high activity. A global score of withdrawal was calculated for each mouse taking into account the relative weight of each sign (adapted from Berrendero et al. (2003)): (horizontal activity + rearings + scratches + genital licks + groomings) × 0.5 + (jumps + front paw tremors + sniffings) × 1 + (body tremors + ptosis + teeth chattering + piloerection) × 1.

In situ hybridization

CCK-cRNA probes preparation. DNA template for CCK cRNA-probes (258–600, 343 bp) was generated by RT-PCR (Sigma, forward primer: 5′-CTGTACCCAAGCTT**GATACATCCAGC AGGTCCGCAAA**-3′, reverse primer: 5′-TTTCCTTGGGAATTC **AGGAAACACTGCCTTCCGACCAC**-3′) using total mouse brain RNA extracted by TRIzol reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise,

France) according to the manufacturer's instructions. The template was cloned into pcDNA3 (Invitrogen) and verified by sequencing. Sequence probe alignment was confirmed with BLASTN 2.2.18 software (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov, NCBI). Next, CCK-cDNA plasmid (20 μg) was linearized by enzymatic digestion of EcoRI for sense probe and HindIII for anti-sense probe, and linearized DNA (1 μg) was transcribed using T7 or Sp6 RNA polymerases (Promega) for sense and anti-sense probes production respectively. For Dig-labeled probes, DIG RNA labeling mix 1X (Roche) was used according to manufacturer's specifications. Quality of the RNA was evaluated by agarose gel electrophoresis (RiboRuler Low Range RNA ladder, Fermentas) and concentration determined by spectrophotometry (Nanodrop Labtech ND-1000). For radiolabeled-probes, CTP-αS^{35} radionucleotides (PerKinElmer) were added to the synthetizing mix. S^{35}-probes were purified by gravity-flow chromatography on illustra NICK Columns (GE Healthcare) and specific activity was measured using a topcount apparatus (Packard).

Tissue preparation. Mice were sacrificed by cervical dislocation, brains were rapidly removed, frozen in OCT (Optimal Cutting Temperature medium, Thermo Scientific) and stored at −80 °C until use. Coronal brain sections (20 μm) were obtained for BLA (−0.8 to −1.8 mm from bregma) according to the mouse brain atlas (Paxinos and Franklin, 2001) using a cryostat microtome (Leica CM3500) at −20 °C. Slides were mounted onto Superfrost slides (Thermo Scientific) and immediately fixed at room temperature (RT) for 15 min with 4% paraformaldehyde (PFA), 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4). Fixed sections were then washed in 0.1 M PB for 15 min, air-dried and stored at -80 °C until use.

In situ hybridization (ISH). Dig- and [^{35}S]-labeled RNA probes were used for ISH, following the methods previously described by Chotteau-Lelievre et al. (2006). Briefly, fixed brain sections kept at −80 °C were thawed at RT for 30 min and rehydrated in 1× PBS for 10 min. Sections were then incubated at 65 °C for 16 h in a hybridization mix [formamide 50% (molecular biology grade, Sigma–Aldrich); dextran sulfate 10%; Denhardt's 1×; tRNA 1 mg/ml (from Baker's yeast, Sigma–Aldrich); NaCl 300 mM; Tris–HCl 20 mM pH 6.8; EDTA 5 mM; NaH_2PO_4 5.4 mM; Na_2HPO_4 4.6 mM; plus 10 mM DTT for radioactive ISH] with either Dig- or S^{35}-labeled RNA probes at the concentrations of 1.5 ng/μl or 20,000 cpm/μl, respectively. DIG-labeled brain sections were afterward incubated with an alkaline phosphatase-labeled anti-DIG antibody (1:1500, Roche) in blocking solution [2% Roche blocking; 20% heat inactivated goat serum, MABT 1×]. Staining was performed with Nitroblue tetrazolium and bromo-chloro-indolyphosphate (NBT/BCIP) as color substrates by incubating the slides in staining solution [polyvinyl alcohol 0.5% (Sigma–Aldrich); NaCl 100 mM; Tris–HCl 100 mM pH 9.5; $MgCl_2$ 50 mM; Tween20 0.1%; NBT 0.35% (Roche); BCIP 0.35% (Roche)] at RT under light-protected conditions until the signal becomes visible (12 h). Next, slides were washed 2 × 10 min (PBS 1×, 1 mM EDTA), air-dried and mounted with Eukitt (VWR). To generate autoradiograms, [^{35}S]-labeled brain sections were exposed to Kodak Biomax MR films (Sigma–Aldrich) at −80 °C for seven days, simultaneously with a [^{14}C] standard (ARC 0146; American Radiolabeled Chemicals). Films were developed with a Kodak MIN-R Processor (Carestream Health).

Image analysis. Brain sections were observed under epifluorescent microscopy (Leica) and autoradiograms under a macroscope and bright lighting. In both cases, images were acquired with a CCD camera (CoolSNAP, Roper Scientific). For autoradiograms, 10 brain sections of each mouse were individually captured as high resolution (600 dpi) 8-bit images. In each section, ImageJ was used to bilaterally draw regions of interest (ROI) and measure mean grey levels in (i) the BLA, where the GFP signal was previously detected, (ii) the striatum, a region lacking CCK mRNA (Schiffmann and Vanderhaeghen, 1991; Meziane et al., 1997), and (iii) the retrosplenial agranular cortex (RSA). Grey level values were then transformed into relative radioactive counts by calibration with the co-exposed [^{14}C] standard using a Rodbard non-linear regression curve. As recommended by Ambesi-Impiombato et al. (2003), radioactive value in the striatum, corresponding to non specific hybridization, was subtracted to both BLA and RSA. As CCK mRNA expression level in RSA was not affected by viral vector injections in the BLA (shScramble group: 92.1 ± 11.8 nCi/g; shCCK group: 94.2 ± 8.7 nCi/g), normalized BLA radioactive values were calculated by dividing BLA value by that in the RSA of the same section.

Statistical analysis

Statistical analysis were performed with Statistica software v8 (www.statsoft.com) and Graph-Pad Prism software v5 (www.graphpad.com). All data are expressed as mean group value ± SEM and statistical significance was defined as $p < 0.05$. Unpaired Student's *t*-test (two-tailed) was used to compare AAV_2-shCCK *vs.* AAV_2-shScramble injected mice in autoradiographic film quantification. As regards to behavioral experiments, a two-way analysis of variance (ANOVA) was used for EPM with cohort and shRNA as between-group factors, and time spent in and number of entries to the open and closed arms as within-group factors. A one-way ANOVA was used in the FST for Cohort 1 to compare immobility and latency time between injected mice, and a two-way ANOVA with repeated measures for bin comparisons. In Cohort 2, a two-way ANOVA with repeated measures was used with shRNA as between-group factor and days/bins as within-group factor. For both cohorts, significant main effects were followed by post-hoc test (Newman Keuls). Place conditioning data were analyzed using a three-way ANOVA with cohort, shRNA and treatment as between-group factors and session (pre- *vs.* post-conditioning) as within-group factor. Data from the scoring of somatic signs of withdrawal were analyzed using two-way ANOVAs with treatment and shRNA as group factors. One-way ANOVA were also used to analyze the data from the OF, LD and TS. Extreme studentized deviate (ESD) method was used to determine significant ($p < 0.05$) outliers. Two mice/group were excluded in Cohort 1 during the forced swim test.

RESULTS

CCK down-regulation in the BLA *in vivo*

In *experiment 1* we evaluated the efficacy of AAV_2-shCCK viral vector *in vivo*. Animals were injected unilaterally in the BLA with either AAV_2-shCCK or control AAV_2-eGFP vectors (see Experimental procedures). Two or six weeks following surgery, brain sections at the level of the BLA were analyzed for cellular integrity, eGFP fluorescence and CCK mRNA expression. Representative images are shown in Fig. 2. For all animals, we found intact 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining and a strong expression of eGFP, confirming the absence of toxicity due to surgery or viral infection and robust transgene expression, respectively. Using AAV_2-eGFP (Fig. 2, top panels), CCK mRNA levels were comparable between injected and contra-lateral non-injected BLAs (data not shown), indicating that surgery and viral infection have no nonspecific effect on CCK expression. On the contrary, 2 or 6 weeks after the surgery, the m*cck* transcript was strongly decreased in AAV_2-shCCK treated mice at the site of injection (Fig. 2, bottom panels). CCK down-regulation perfectly overlapped the viral spread after 2 and 6 weeks, as revealed by eGFP detection, demonstrating

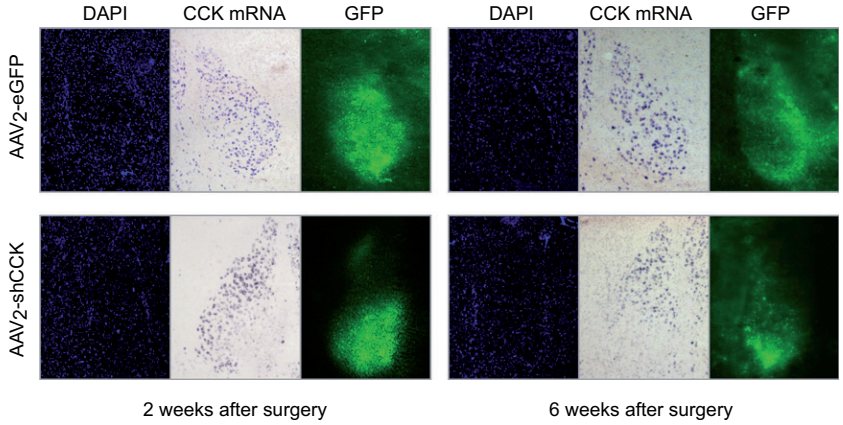


Fig. 2. AAV_2-shCCK injections in the BLA reduces CCK mRNA levels. Representative brain microsections showing DAPI staining (left), dig-labeled CCK mRNA (middle), and eGFP expression (right) of mice unilaterally injected into BLA with either AAV_2-eGFP (top panels) or AAV_2-shCCK (bottom panels) viral vectors (1.5 µl, 3×10^{11}vg/ml). Mice were sacrificed for tissue collection either 2 or 6 weeks following surgery. CCK mRNA downregulation is observed in AAV_2-shCCK but not AAV_2-eGFP control samples, in an area overlapping maximal viral expression.

efficacy and stability of shRNA-induced CCK down-regulation in the BLA. The extent of down-regulation was quantified in a further experiment (*experiment 2*), after behavioral testing (see below).

Behavioral effects of CCK down-regulation in the BLA

In *experiment 2* we prepared two cohorts of animals injected bilaterally with either AAV_2-shCCK or AAV_2-shScramble (see Experimental procedures) and examined emotional responses in either an extended (Cohort 1) or more limited (Cohort 2) test series (see Fig. 1).

Anxiety like-behavior. We first examined whether CCK mRNA down-regulation in BLA influences levels of anxiety. In the EPM, data from the two cohorts showed no statistical difference and were pooled (Fig. 3). AAV_2-shCCK injected mice spent more time (Cohort: $F_{(1,40)} = 3.92$, NS; shRNA: $F_{(1,40)} = 1.89$, NS; arms: $F_{(1,40)} = 25.19$, $p < 0.001$; shRNA $\times$ arms interaction $F_{(1,40)} = 8.44$, $p < 0.01$) and entered more often in open arms (Cohort: $F_{(1,40)} = 3.58$, NS; shRNA: $F_{(1,40)} = 0.93$, NS; arms: $F_{(1,40)} = 24.04$, $p < 0.001$; shRNA $\times$ arms interaction $F_{(1,40)} = 19.04$, $p < 0.001$) as compared to AAV_2-shScramble injected controls (Fig. 3A). This indicates that AAV_2-shCCK treatment resulted in decreased anxiety-like behavior. Accordingly, time (Cohort: $F_{(1,40)} = 0.69$, NS; shRNA: $F_{(1,40)} = 8.50$, $p < 0.01$) and entry (Cohort: $F_{(1,40)} = 3.99$, NS; shRNA: $F_{(1,40)} = 16.63$, $p < 0.001$) ratios were increased in AAV_2-shCCK injected mice (Fig. 3A). Total distance traveled in the maze was similar between groups (Cohort: $F_{(1,40)} = 3.03$, NS; shRNA: $F_{(1,40)} = 0.11$, NS), suggesting that CCK knock-down had no effect on locomotor activity (Fig. 3A).

AAV_2-shCCK injected mice also showed increased risk-taking behavior, as illustrated in Fig. 3B. These mice displayed increased total number of head-dips (Cohort: $F_{(1,40)} = 0.075$, NS; shRNA: $F_{(1,40)} = 7.39$, $p < 0.01$), increased number of head-dips from the distal part of the open arms (Cohort: $F_{(1,40)} = 2.67$, NS; shRNA: $F_{(1,40)} = 9.47$, $p < 0.01$) and increased time spent in the distal part of the open arms (Cohort: $F_{(1,40)} = 0.51$, NS; shRNA: $F_{(1,40)} = 5.40$, $p < 0.05$) compared to AAV_2-shScramble.

Animals from Cohort 1 were further tested for anxiety-like behavior in the OF and the LD. No significant difference between AAV_2-shCCK and AAV_2-shScramble groups was found in these tests (Table 1).

Despair-like behavior. We next analyzed the effects of CCK mRNA down-regulation in BLA on despair behavior in the forced swim test. In the first animal cohort (Fig. 4A), AAV_2-shCCK injected mice showed less immobility time as compared to AAV_2-shScramble injected mice ($F_{(1,19)} = 17.87$, $p < 0.001$), suggesting a reduction in despair-like behavior. When split into 2-min time bins, differences in immobility time appeared significant during the last two bins (shRNA: $F_{(1,19)} = 17.87$, $p < 0.001$; Bins: $F_{(2,38)} = 81.52$, $p < 0.001$; Newman Keuls: Bin 1, NS; Bin 2, $p < 0.01$; Bin 3, $p < 0.05$). No significant difference between groups was detected for latency to the first immobility episode ($F_{(1,19)} = 0.68$, NS).

In the second animal cohort, tested under less stressful conditions (Fig. 4B), repeated measure ANOVA revealed a significant decrease of total immobility in AAV_2-shCCK-treated mice as compared to AAV_2-shScramble-treated animals on the second day of testing, and a significant effect of test repetition only in AAV_2-shScramble injected mice (shRNA: $F_{(1,17)} = 9.68$, $p < 0.01$; Days: $F_{(1,17)} = 17.98$, $p < 0.001$; Newman Keuls: shScramble day1 *vs.* day2, $p < 0.01$; shCCK day1 *vs.* day2, NS; day 1 shScramble *vs.* shCCK, NS; day 2 shScramble *vs.* shCCK, $p < 0.001$). When split into 2-min time bins, differences in immobility time also appeared significant on the second day of testing (day 1 shRNA: $F_{(1,17)} = 3.75$, NS; bins: $F_{(2,34)} = 90.66$, $p < 0.001$; day 2 shRNA: $F_{(1,17)} = 11.34$, $p < 0.01$; bins: $F_{(2,34)} = 16.07$, $p < 0.001$). Latency to the first immobility episode was increased in shCCK-injected mice on day 1 (shRNA: $F_{(1,17)} = 4.54$, $p < 0.05$; days: $F_{(1,17)} = 121.76$, $p < 0.001$; Newman Keuls: shScramble day1 *vs.* day2, $p < 0.001$; shCCK day1 *vs.* day2, $p < 0.001$; day 1 shScramble *vs.* shCCK, $p < 0.05$; day 2 shScramble *vs.* shCCK, NS). Altogether, these

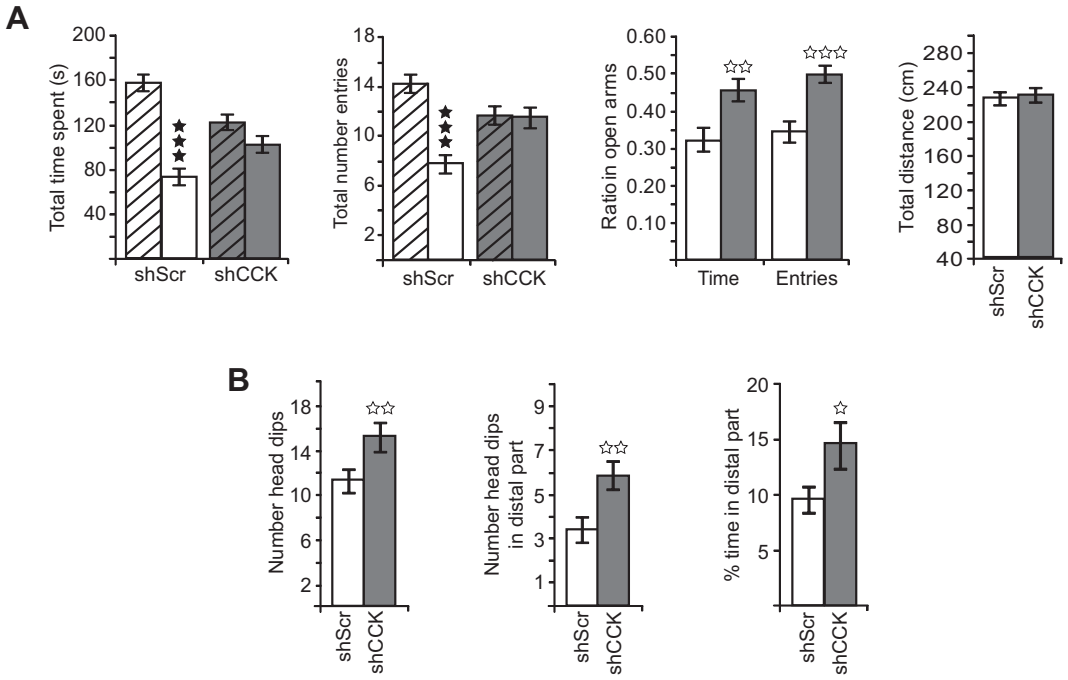


Fig. 3. CCK knockdown in mouse BLA reduces levels of anxiety in the elevated plus-maze. Mice were bilaterally injected into BLA with either AAV_2-shCCK (grey bars) or AAV_2-shScramble (white bars) viral vectors and tested in the EPM. (A) Anxiety-like behavior. AAV_2-shCCK-injected mice showed lower levels of anxiety, as indicated by time spent and number of entries in open (full bars) *vs.* closed (striped bars) arms. Ratios of the time spent in and the number of entries to the open arms ((open arm)/(open arm + closed arms)) and total distance travelled are also shown. (B) Risk-taking behavior. AAV_2-shCCK-injected mice showed increased risk-taking behavior as determined by number of total head dips in the open arms, number of head dips from the distal part of the open arms (last 1/3 of the arm) and percentage time spent in the distal part of the open arms. All results are expressed as mean ± SEM. Black stars, comparisons between arms; White stars, comparisons between shRNA. ★★★$p < 0.001$, ☆$p < 0.05$, ☆☆$p < 0.01$, ☆☆☆$p < 0.001$ (two-way ANOVA; $n = 22$ mice/group).

Table 1. Anxiety responses in the open field and light/dark box tests, and despair behavior in the tail suspension test were not modified by CCK knockdown in the mouse BLA. Data expressed in mean ± SEM ($n = 12$–13 mice/group)D

TEST	Parameter	shScramble	shCCK	One-way ANOVA	
				$F_{(1,23)}$	p
Open field	% of time spent in center	8.11 ± 0.75	7.562 ± 0.55	0.29	NS
	n° of immobility episodes	6.58 ± 2.05	4.08 ± 1.03	1.25	NS
	Total distance travelled	1480 ± 122.98	1508 ± 76.01	0.04	NS
	n° of rearings	144.92 ± 6.96	147.54 ± 6.76	0.07	NS
	n° of groomings	11.92 ± 1.47	11.46 ± 1.1	0.06	NS
Light/dark box	% of time spent in light side	18.34 ± 2.31	20.09 ± 2.6	0.25	NS
	Latency to light side	48.83 ± 13.31	32.69 ± 7.38	1.17	NS
	n° of entries in light side	5.83 ± 0.67	6.71 ± 0.63	2.30	NS
Tail suspension	% of immobility time	41.02 ± 3.7	39.46 ± 4.65	0.07	NS
	Latency to first immobility	97.03 ± 11.4	113.18 ± 13.74	2.11	NS

results suggest that down-regulating CCK expression in the amygdala decreases despair-like behavior.

Animals from Cohort 1 were further tested in the tail suspension paradigm. No statistical difference was detected for any behavioral parameter in this test (Table 1).

Aversive place conditioning. We evaluated the ability of AAV_2-shCCK injected mice to acquire CPA to naloxone. Statistical analysis showed no significant effect of cohort (Cohort: $F_{(1,36)} = 0.39$, NS) and data from the two cohorts were pooled (Fig. 5). ANOVA revealed a significant effect of naloxone treatment and conditioning sessions (treatment: $F_{(1,36)} = 7.20$, $p < 0.01$; session $F_{(1,36)} = 11.57$, $p < 0.001$; session x treatment interaction $F_{(1,36)} = 9.08$, $p < 0.01$), indicating that naloxone produced conditioned place aversion under our experimental conditions. There was no effect of AAV_2-shCCK injections (shRNA: $F_{(1,36)} = 1.45$, NS) and no interaction with naloxone treatment (shRNA × treatment interaction $F_{(1,36)} = 0.05$, NS). Post-hoc analysis indicated that the AAV_2-shScramble naloxone-treated post-conditioning group was significantly different from both AAV_2-shScramble naloxone-treated

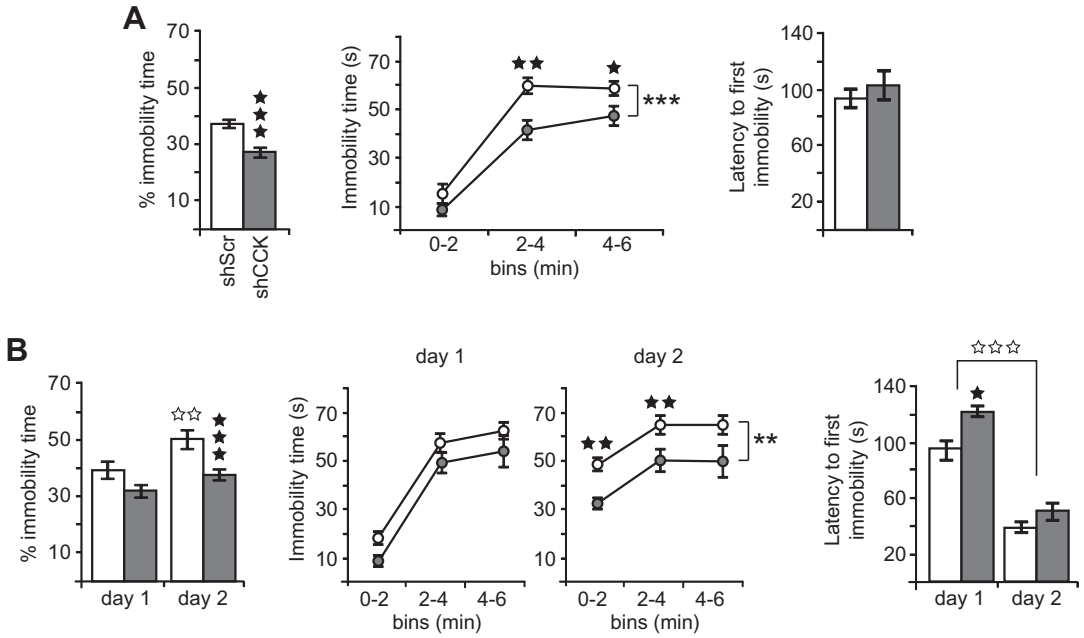


Fig. 4. CCK knockdown in mouse BLA reduces despair-like behavior in the forced swim test. Mice were bilaterally injected into BLA with either AAV_2-shCCK (grey bars and circles) or AAV_2-shScramble (white bars and circles) viral vectors and tested in the FST. AAV_2-shCCK-injected mice showed reduced despair-like behavior in both Cohort 1 (A) and Cohort 2 (B) as evaluated by percentage of immobility time during the 6 min test, time course of immobility in 2 min bins (seconds) and latency to the first immobility episode (seconds). For Cohort 2, data from repeated FST on day 1 and 2 are shown. All results are expressed as mean ± SEM. Black stars, individual comparisons between shRNA; asterisks, global time courses comparisons between shRNAs; white stars, comparisons between days. $^{\star}p < 0.05$, $^{\star}p < 0.01$, $^{\star}p < 0.001$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$, $^{☆}p < 0.01$, $^{☆☆☆}p < 0.001$ (one- and two-way ANOVA; n = 10–11 mice/group in Cohort 1, 9–10 mice/group in Cohort 2).

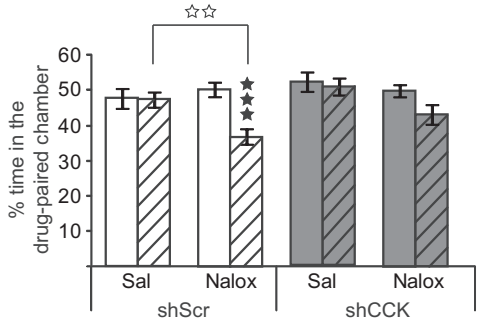


Fig. 5. CCK knockdown in mouse BLA reduces naloxone-induced place aversion (CPA). Mice were bilaterally injected into BLA with either AAV_2-shCCK (grey bars) or AAV_2-shScramble (white bars) viral vectors. Naloxone place conditioning is shown as percentage of time spent in the drug-paired compartment during pre- (full bars) and post-conditioning (striped bars) sessions. Post-hoc analyses show that naloxone produced significant CPA in AAV_2-shScramble but not in AAV_2-shCCK mice. Results are expressed as mean ± SEM. Black stars, individual comparisons between sessions; white stars, individual comparisons between treatments. $^{\star\star\star}p < 0.001$; $^{☆☆}p < 0.01$ (three-way ANOVA; $n = 11$ mice/group).

pre-conditioning group ($p < 0.001$) and AAV_2-shScramble saline-treated post-conditioning group ($p < 0.01$). On the contrary, the AAV_2-shCCK naloxone-treated post-conditioning group were neither different from AAV_2-shCCK naloxone-treated pre-conditioning ($p > 0.05$) nor AAV_2-shCCK saline-treated post-conditioning ($p > 0.05$) groups, suggesting that AAV_2-shCCK mice did not show a strong aversion to the naloxone-paired compartment and that CCK down-regulation in the BLA reduces aversive place conditioning.

Physical dependence to morphine. Finally, we examined the effects of CCK down-regulation on somatic signs of morphine-precipitated withdrawal. A significant morphine withdrawal syndrome was observed after naloxone administration in both AAV_2-shCCK and AAV_2-shScramble injected mice (horizontal activity: shRNA $F_{(1,12)} = 0.00$, NS; treatment $F_{(1,12)} = 8.54$, $p < 0.01$; rearing: shRNA $F_{(1,12)} = 2.18$, NS; treatment $F_{(1,12)} = 30.93$, $p < 0.001$; jumping: shRNA $F_{(1,12)} = 1.17$, NS; treatment $F_{(1,12)} = 26.34$, $p < 0.001$; front paw tremors: shRNA $F_{(1,12)} = 1.40$, NS; treatment $F_{(1,12)} = 42.46$, $p < 0.001$; scratches: shRNA $F_{(1,12)} = 0.04$, NS; treatment $F_{(1,12)} = 12.94$, $p < 0.01$; genital licks: shRNA $F_{(1,12)} = 0.45$, NS; treatment $F_{(1,12)} = 2.17$, NS; grooming: shRNA $F_{(1,12)} = 0.08$, NS; treatment $F_{(1,12)} = 13.25$, $p < 0.01$; body tremor: shRNA $F_{(1,12)} = 0.33$, NS; treatment $F_{(1,12)} = 8.33$, $p < 0.01$; ptosis: shRNA $F_{(1,12)} = 0.20$, NS; treatment $F_{(1,12)} = 88.20$, $p < 0.001$; mastication: shRNA $F_{(1,12)} = 0.00$, NS; treatment $F_{(1,12)} = 338.00$, $p < 0.001$; piloerection: shRNA $F_{(1,12)} = 0.00$, NS; treatment $F_{(1,12)} = 450.00$, $p < 0.001$) (see Table 2). Two-way ANOVA analysis of global withdrawal score (Fig. 6) showed a significant effect of treatment ($F_{(1,12)} = 10.10$, $p < 0.001$) but no effect of shRNA injection ($F_{(1,12)} = 0.17$, NS). Thus the viral treatment had no effect on somatic signs of morphine withdrawal.

Accuracy and efficiency of CCK down-regulation in the BLA in behaviorally tested animals

In *experiment 2*, after the last behavioral experiment, we examined accuracy of viral injections in the BLA (Fig. 7). Most animals showed viral expression in the BLA and animals showing absent or misplaced eGFP expression were excluded from statistical analysis (Cohort 1: 7 mice; Cohort 2: 5 mice, Fig. 7A). Qualitative ISH confirmed CCK down-regulation (Fig. 7B). Quantification was performed using [^{35}S]-ISH and showed a significant 35% reduction of CCK mRNA probe binding in the BLA (Unpaired Student's *t*-test, $t = 3.17$, $p < 0.01$) of AAV_2-shCCK injected mice, as compared to controls (AAV_2-shScramble) (Fig. 7C). Together with *experiment 1*, therefore, these results confirm efficient – although partial – down-regulation of CCK expression in the BLA throughout the behavioral analysis.

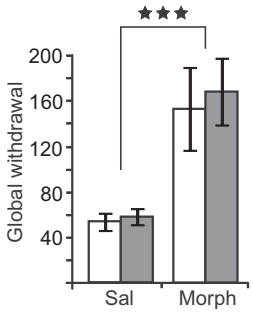


Fig. 6. CCK knockdown in mouse BLA does not modify naloxone-precipitated withdrawal after chronic morphine treatment. Mice were bilaterally injected into BLA with either AAV_2-shCCK (grey bars) or AAV_2-shScramble (white bars) viral vectors, subjected to a chronic morphine regimen and naloxone-precipitated withdrawal. The global withdrawal score is shown ((horizontal activity + rearings + scratches + genital licks + head shakes + wet dog shakes + grooming) × 0.5 + (jumps + front paw tremors + sniffings) × 1 + (body tremors + ptosis + teeth chattering + piloerection) × 1), expressed as mean ± SEM. Naloxone-precipitated withdrawal did not differ between the two groups. ★★★$p < 0.01$ (two-way ANOVA; $n = 4$ mice/group).

DISCUSSION

The aim of the present study was to examine the role of CCK expressed at the level of the basolateral nucleus of the amygdala in negative emotional responses. We used a local shRNA approach to evaluate the implication of amygdalar CCK in several behavioral responses, including anxiety and despair-like behaviors, aversive place conditioning and morphine withdrawal syndrome.

CCK has been largely implicated in anxiety-related behaviors as demonstrated in human studies (Berna et al., 2007; Eser et al., 2011), as well as in animal models using either pharmacological (Rotzinger et al., 2010; Wang et al., 2011) or genetic approaches (Dauge et al., 2001; Raud et al., 2005; Chen et al., 2010). Our data from the EPM experiments showed a significant enhancement of exploration in the open arms and increased risk-taking behavior in two independent cohorts of mice with down-regulated amygdalar CCK. The observed effects are not attributable to general activity changes, because shRNA treatment produced no change in total locomotor activity in this test. Our results therefore show that CCK down-regulation decreases levels of anxiety, in agreement with the well-established anxiogenic role of CCK in previous reports. Notably, we found no effect of the CCK knockdown in two other behavioral models of anxiety, the OF and the LD. This could be due to handling and test history effects, as previously reported by Voikar et al. (2004), or to qualitative and quantitative differences across the three anxiety tests (Cryan and Holmes, 2005). All three models are primarily based on free exploration of novel environments, but involve different stressful stimuli (Ramos, 2008), therefore similar levels of anxiety may express differently across these tests (van Gaalen and Steckler, 2000). Further, distinct genes (Turri et al., 2001) and brain networks (Menard and Treit, 1999) contribute to the behavioral responses across tests, and amygdala may be a stronger contributor to behaviors in the EPM under our experimental conditions. Finally, the EPM generally represents a more stressful situation for mice (Holmes et al., 2003) compared to the OF or LD, which may be a

Table 2. Individual signs of naloxone-precipitated withdrawal in AAV_2-shCCK and AAV_2-shScramble injected mice after chronic morphine treatment. Data expressed in mean ± SEM ($n = 4$ mice/group)

Somatic signs of withdrawal	shScramble		shCCK		One-way ANOVA			
					Treatment comparison shScramble		Treatment comparison shCCK	
	Saline	Morphine	Saline	Morphine	$F_{(1,6)}$	p	$F_{(1,6)}$	p
Horizontal activity	5.50 ± 0.20	3.75 ± 0.63	5.13 ± 0.52	4.13 ± 0.43	7.00	0.05	2.23	NS
Rearings	80.75 ± 6.86	45.00 ± 6.75	91.75 ± 9.03	53.75 ± 1.32	13.81	0.01	17.34	0.01
Jumpings	0.00	51.75 ± 12.34	0.00	33.75 ± 11.19	15.59	0.01	9.09	0.05
Front paw tremors	1.25 ± 0.75	64.00 ± 18.22	1.50 ± 0.87	91.50 ± 14. 70	11.83	0.01	37.35	0.00
Scratches	4.50 ± 2.10	0.00	4.00 ± 1.08	0.00	4.58	NS	13.17	0.05
Genital licks	2.50 ± 1.50	0.75 ± 0.75	1.50 ± 0.65	0.50 ± 0.50	1.09	NS	1.50	NS
Groomings	10.00 ± 2.45	3.25 ± 1.44	9.00 ± 0.91	3.25 ± 1.70	5.65	NS	8.86	0.05
Body tremor	0.00	1.5 ± 0.71	0.00	1.00 ± 0.58	5.40	NS	3.00	NS
Ptosis	0.00	2.5 ± 0.29	0.00	2.75 ± 0.48	75.00	0.001	33.00	0.001
Mastication	0.00	3.25 ± 0.25	0.00	3.25 ± 0.25	169.00	0.001	169.00	0.001
Piloerection	0.00	3.75 ± 0.25	0.00	3.75 ± 0.25	225.00	0.001	225.00	0.001

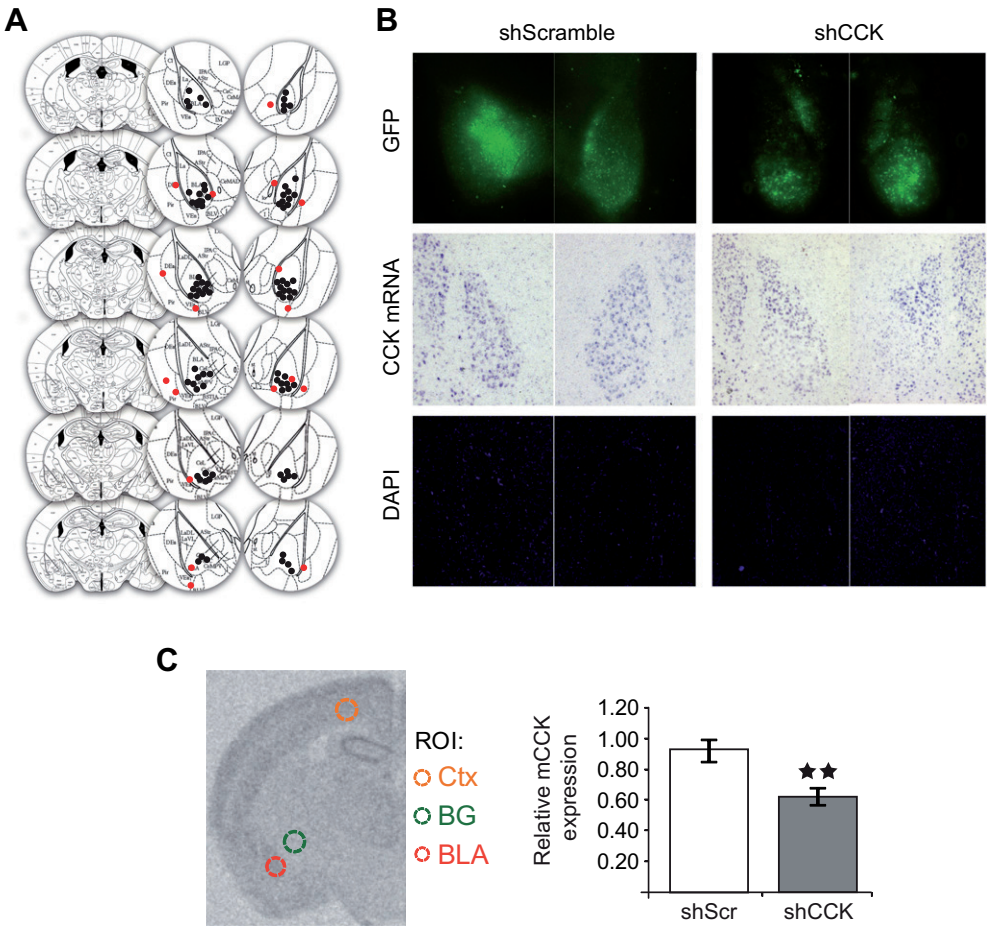


Fig. 7. Quantitative validation of AAV_2-shRNA-CCK knockdown into the mouse BLA. Mice were sacrificed for tissue collection 9 weeks after surgery. (A) Images from the Mouse Brain Atlas of Paxinos and Franklin (2001) showing histological reconstruction of injection sites into BLA. Black circles: correct injections of shCCK and shScramble vectors; red circles: misplaced injections. (B) Representative brain sections showing eGFP expression (up), dig-labeled CCK mRNA (middle) and DAPI staining (bottom) from mice bilaterally injected into BLA with either AAV_2-shScramble (left), or AAV_2-shCCK (right) viral vectors (1.5 µl, 3×10^{11} vg/ml). As in Fig. 2, lower CCK mRNA is observed at the site of maximal viral expression in shCCK, but not shScramble, samples. (C) Left; representative autoradiographic image of a brain section processed for radioactive-ISH showing regions of interest (ROI) used in the quantification (Ctx, RAS cortex region; BG, Striatum BackGround; BLA, BasoLateral nucleus of the Amygdala). Right; quantification performed using a calibration curve of C^{14} standards (ARC0146; American Radiolabeled Chemicals) and the ImageJ software. A rodbard non-lineal regression function was used to convert grey levels into counts of radioactivity (nCi/mg). CCK mRNA expression is significantly reduced in the BLA of AAV_2-shCCK treated animals (grey bar) compared to their AAV2-shScramble controls (white bar). Results are expressed in normalized values obtained from mean radioactive measures [(BLA – Striatum background)/(RAS Cortex – Striatum background)] ± SEM. $^{\star\star}p < 0.01$ (Unpaired Student's *t*-test; $n = 5$ mice/condition).

more favorable situation to reveal decreased anxiety in mice with down regulated CCK.

The observation that local CCK down-regulation, specifically at the level of BLA, strongly modifies behavioral parameters in the EPM reveals a main role for amygdalar CCK in the regulation of anxiety. This is consistent with the notion that high CCK activity in the amygdala is associated with high levels of anxiety. Sherrin et al. (2009) demonstrated that both CCK mRNA expression levels and CCK_2-R immunoreactivity were elevated in BLA of mice presenting anxiogenic responses in the OF and EPM test, both elicited by pretreatment with an agonist for corticotrophin-releasing factor receptor 1. Also, studies in rats showed that local activation of amygdalar CCK_2-R reduced time spent in open arms of the plus-maze (Belcheva et al., 1994) and potentiated the startle response in the acoustic startle test (Frankland et al., 1997). These studies together with our data suggest that CCK acting at local CCK_2-R receptors of the BLA increases levels of anxiety. This mechanism is in accordance with anatomical and electrophysiological studies indicating that CCK and CCK_2-R are mainly expressed in GABAergic interneurons of the BLA (Chung and Moore, 2009; Jasnow et al., 2009). Altogether therefore, the data suggest that a large part of anxiogenic activity of the CCK system operates via local mechanisms within the BLA, likely at the level of GABAergic interneurons. We cannot exclude, however, that CCK possibly expressed at the level of glutamatergic neurons in the BLA (Mascagni and McDonald, 2003) and acting at receptors in BLA projections areas may also be involved, and this will be investigated in future studies. In addition, CCK expressed in

cortical afferent neurons to the BLA may also contribute to regulate anxiety-like behaviors upstream the BLA within the cortico-amygdala circuitry.

The CCK system was also involved in depressive-related behaviors, although this aspect of CCK function is less-well documented. Polymorphisms of the CCK gene were associated with susceptibility for suicidal behavior (Shindo and Yoshioka, 2005; Berna et al., 2007). In preclinical studies, systemic administration of CCK_2-R antagonists decreased immobility in the forced swim test after chronic social defeat (Becker et al., 2008), with synergistic effects of the enkephalinase inhibitor RB101 (Hernando et al., 1996). In agreement with these previous reports, our data show a reduction of despair-like behavior upon AAV_2-shCCK treatment in the forced swim test. The antidepressant-like effect of CCK down-regulation was not detected in the TS. The two tests share common predictive validity (Kulkarni and Dhir, 2007) but show different sensitivities in response to experimental manipulations and environmental factors (Miller et al., 2010) and engage different neurochemical substrates (Renard et al., 2003), particularly in C57Bl6/J mice used in the present study (Mineur et al., 2006; Goeldner et al., 2011). Importantly, our finding that local CCK down-regulation specifically in the BLA reduces despair behavior in the forced swim test demonstrates for the first time a key role for amygdalar CCK in depressive-like responses. As for anxiety-related behaviors, the modulation of depressive states by CCK expressed at the level of the BLA may recruit local mechanisms, which requires further investigation.

Finally CCK was also involved in aversive responses (Valverde and Roques, 1998; Mitchell et al., 2006) and we evaluated the effect of local CCK mRNA down-regulation in two aversive situations, i.e. place aversion induced by naloxone and the physical consequences of morphine withdrawal. AAV_2-shCCK injected mice showed a trend toward reduced place aversion in the naloxone-induced CPA paradigm, suggesting that CCK either contributes to aversive properties of naloxone or participates in place learning (Le Merrer et al., 2011), at least partially. Further investigations will be necessary to clarify whether decreased naloxone-CPA may reflect a role of amygdalar CCK in cognition or hedonic homeostasis. We otherwise found no effect of amygdalar CCK down-regulation in somatic signs of morphine withdrawal, although naloxone-precipitated withdrawal was increased in CCK_2-R KO mice (Pommier et al., 2002). It is likely that local CCK in the amygdala does not substantially contribute to the physical withdrawal syndrome, which engages many transmitter systems throughout the brain (Koob and Volkow, 2010).

CONCLUSION

In conclusion, this study establishes that CCK produced at the level of amygdala increases levels of anxiety and favors despair behavior, possibly via local activity. This neural mechanism may contributes to mood homeostasis in humans, and be a causal factor in panic disorder and depression.

Acknowledgements—We would like to thank Gilles Duval and Dzemailj Memedov for animal care, as well as Pascal Kessler, Muriel Koch and Didier Hentsch for help in image acquisition, analysis and quantification. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, and Université de Strasbourg. We thank the European Union (GENADDICT/FP6 005166), and the National Institutes of Health (NIAAA AA-16658 and NIDA DA-16768), for financial support.

REFERENCES

Ambesi-Impiombato A, D'Urso G, Muscettola G, de Bartolomeis A (2003) Method for quantitative in situ hybridization histochemistry and image analysis applied for Homer1a gene expression in rat brain. Brain Res Brain Res Protoc 11:189–196.

Becker C, Zeau B, Rivat C, Blugeot A, Hamon M, Benoliel JJ (2008) Repeated social defeat-induced depression-like behavioral and biological alterations in rats: involvement of cholecystokinin. Mol Psychiatry 13:1079–1092.

Beinfeld MC (2001) An introduction to neuronal cholecystokinin. Peptides 22:1197–1200.

Belcheva I, Belcheva S, Petkov VV, Petkov VD (1994) Asymmetry in behavioral responses to cholecystokinin microinjected into rat nucleus accumbens and amygdala. Neuropharmacology 33:995–1002.

Berna MJ, Tapia JA, Sancho V, Jensen RT (2007) Progress in developing cholecystokinin (CCK)/gastrin receptor ligands that have therapeutic potential. Curr Opin Pharmacol 7:583–592.

Bradwejn J, Koszycki D (2001) Cholecystokinin and panic disorder: past and future clinical research strategies. Scand J Clin Lab Invest Suppl 234:19–27.

Cain BM, Connolly K, Blum A, Vishnuvardhan D, Marchand JE, Beinfeld MC (2003) Distribution and colocalization of cholecystokinin with the prohormone convertase enzymes PC1, PC2, and PC5 in rat brain. J Comp Neurol 467:307–325.

Chen Q, Tang M, Mamiya T, Im HI, Xiong X, Joseph A, Tang YP (2010) Bi-directional effect of cholecystokinin receptor-2 overexpression on stress-triggered fear memory and anxiety in the mouse. PLoS One 5:e15999.

Chotteau-Lelievre A, Dolle P, Gofflot F (2006) Expression analysis of murine genes using in situ hybridization with radioactive and nonradioactively labeled RNA probes. Methods Mol Biol 326:61–87.

Chung L, Moore SD (2009) Cholecystokinin excites interneurons in rat basolateral amygdala. J Neurophysiol 102:272–284.

Cryan JF, Holmes A (2005) The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. Nat Rev Drug Discov 4:775–790.

Dauge V, Sebret A, Beslot F, Matsui T, Roques BP (2001) Behavioral profile of CCK2 receptor-deficient mice. Neuropsychopharmacology 25:690–698.

Duangdao DM, Clark SD, Okamura N, Reinscheid RK (2009) Behavioral phenotyping of neuropeptide S receptor knockout mice. Behav Brain Res 205:1–9.

Eser D, Uhr M, Leicht G, Asmus M, Langer A, Schule C, Baghai TC, Mulert C, Rupprecht R (2011) Glyoxalase-I mRNA expression and CCK-4 induced panic attacks. J Psychiatr Res 45:60–63.

Frankland PW, Josselyn SA, Bradwejn J, Vaccarino FJ, Yeomans JS (1997) Activation of amygdala cholecystokininB receptors potentiates the acoustic startle response in the rat. J Neurosci 17:1838–1847.

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

Frenois F, Stinus L, Di Blasi F, Cador M, Le Moine C (2005) A specific limbic circuit underlies opiate withdrawal memories. J Neurosci 25:1366–1374.

Goeldner C, Lutz PE, Darcq E, Halter T, Clesse D, Ouagazzal AM, Kieffer BL (2011) Impaired emotional-like behavior and

serotonergic function during protracted abstinence from chronic morphine. Biol Psychiatry 69:236–244.
Hebb AL, Poulin JF, Roach SP, Zacharko RM, Drolet G (2005) Cholecystokinin and endogenous opioid peptides: interactive influence on pain, cognition, and emotion. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 29:1225–1238.
Hernando F, Fuentes JA, Fournie-Zaluski MC, Roques BP, Ruiz-Gayo M (1996) Antidepressant-like effects of CCK(B) receptor antagonists: involvement of the opioid system. Eur J Pharmacol 318:221–229.
Holmes A, Kinney JW, Wrenn CC, Li Q, Yang RJ, Ma L, Vishwanath J, Saavedra MC, Innerfield CE, Jacoby AS, Shine J, Iismaa TP, Crawley JN (2003) Galanin GAL-R1 receptor null mutant mice display increased anxiety-like behavior specific to the elevated plus-maze. Neuropsychopharmacology 28:1031–1044.
Jasnow AM, Ressler KJ, Hammack SE, Chhatwal JP, Rainnie DG (2009) Distinct subtypes of cholecystokinin (CCK)-containing interneurons of the basolateral amygdala identified using a CCK promoter-specific lentivirus. J Neurophysiol 101:1494–1506.
Koob GF, Volkow ND (2010) Neurocircuitry of addiction. Neuropsychopharmacology 35:217–238.
Kulkarni SK, Dhir A (2007) Effect of various classes of antidepressants in behavioral paradigms of despair. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 31:1248–1254.
Le Merrer J, Plaza-Zabala A, Del Boca C, Matifas A, Maldonado R, Kieffer BL (2011) Deletion of the delta opioid receptor gene impairs place conditioning but preserves morphine reinforcement. Biol Psychiatry 69:700–703.
LeDoux JE (2000) Emotion circuits in the brain. Annu Rev Neurosci 23:155–184.
Lu L, Zhang B, Liu Z, Zhang Z (2002) Reactivation of cocaine conditioned place preference induced by stress is reversed by cholecystokinin-B receptors antagonist in rats. Brain Res 954:132–140.
Mascagni F, McDonald AJ (2003) Immunohistochemical characterization of cholecystokinin containing neurons in the rat basolateral amygdala. Brain Res 976:171–184.
Matthes HW, Maldonado R, Simonin F, Valverde O, Slowe S, Kitchen I, Befort K, Dierich A, Le Meur M, Dolle P, Tzavara E, Hanoune J, Roques BP, Kieffer BL (1996) Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. Nature 383:819–823.
McIlwain KL, Merriweather MY, Yuva-Paylor LA, Paylor R (2001) The use of behavioral test batteries: effects of training history. Physiol Behav 73:705–717.
Menard J, Treit D (1999) Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. Neurosci Biobehav Rev 23(4):591–613.
Meziane H, Devigne C, Tramu G, Soumireu-Mourat B (1997) Distribution of cholecystokinin immunoreactivity in the BALB/c mouse forebrain: an immunocytochemical study. J Chem Neuroanat 12:191–209.
Miller BH, Schultz LE, Gulati A, Su AI, Pletcher MT (2010) Phenotypic characterization of a genetically diverse panel of mice for behavioral despair and anxiety. PLoS One 5:e14458.
Mineur YS, Belzung C, Crusio WE (2006) Effects of unpredictable chronic mild stress on anxiety and depression-like behavior in mice. Behav Brain Res 175:43–50.
Mitchell JM, Bergren LJ, Chen KS, Fields HL (2006) Cholecystokinin is necessary for the expression of morphine conditioned place preference. Pharmacol Biochem Behav 85:787–795.
Mutt V, Jorpes JE (1968) Structure of porcine cholecystokinin-pancreozymin. 1. Cleavage with thrombin and with trypsin. Eur J Biochem 6:156–162.
Noble F, Roques BP (2002) Phenotypes of mice with invalidation of cholecystokinin (CCK(1) or CCK(2)) receptors. Neuropeptides 36:157–170.
Noble F, Wank SA, Crawley JN, Bradwejn J, Seroogy KB, Hamon M (1999) International Union of Pharmacology. XXI. Structure, distribution, and functions of cholecystokinin receptors. Pharmacol Rev 51:745–781.
Paxinos G, Franklin KBJ (2001) The mouse brain in stereotaxic coordinates. 2nd ed. Academic Press.
Pommier B, Beslot F, Simon A, Pophillat M, Matsui T, Dauge V, Roques BP, Noble F (2002) Deletion of CCK2 receptor in mice results in an upregulation of the endogenous opioid system. J Neurosci 22:2005–2011.
Ramos A (2008) Animal models of anxiety: do I need multiple tests? Trends Pharmacol Sci 29(10):493–498.
Raud S, Innos J, Abramov U, Reimets A, Koks S, Soosaar A, Matsui T, Vasar E (2005) Targeted invalidation of CCK2 receptor gene induces anxiolytic-like action in light-dark exploration, but not in fear conditioning test. Psychopharmacology (Berl) 181:347–357.
Renard CE, Dailly E, David DJ, Hascoet M, Bourin M (2003) Monoamine metabolism changes following the mouse forced swimming test but not the tail suspension test. Fundam Clin Pharmacol 17:449–455.
Rotzinger S, Lovejoy DA, Tan LA (2010) Behavioral effects of neuropeptides in rodent models of depression and anxiety. Peptides 31:736–756.
Schiffmann SN, Vanderhaeghen JJ (1991) Distribution of cells containing mRNA encoding cholecystokinin in the rat central nervous system. J Comp Neurol 304:219–233.
Sherrin T, Todorovic C, Zeyda T, Tan CH, Wong PT, Zhu YZ, Spiess J (2009) Chronic stimulation of corticotropin-releasing factor receptor 1 enhances the anxiogenic response of the cholecystokinin system. Mol Psychiatry 14:291–307.
Shindo S, Yoshioka N (2005) Polymorphisms of the cholecystokinin gene promoter region in suicide victims in Japan. Forensic Sci Int 150:85–90.
Turri MG, Datta SR, DeFries J, Henderson ND, Flint J (2001) QTL analysis identifies multiple behavioral dimensions in ethological tests of anxiety in laboratory mice. Curr Biol 11(10):725–734.
Valverde O, Roques BP (1998) Cholecystokinin modulates the aversive component of morphine withdrawal syndrome in rats. Neurosci Lett 244:37–40.
van Gaalen MM, Steckler T (2000) Behavioural analysis of four mouse strains in an anxiety test battery. Behav Brain Res 115(1):95–106.
Voikar V, Vasar E, Rauvala H (2004) Behavioral alterations induced by repeated testing in C57BL/6J and 129S2/Sv mice. implications for phenotyping screens. Genes Brain Behav 3:27–38.
Wang H, Spiess J, Wong PT, Zhu YZ (2011) Blockade of CRF1 and CCK2 receptors attenuated the elevated anxiety-like behavior induced by immobilization stress. Pharmacol Biochem Behav 98:362–368.
Zolotukhin S, Potter M, Zolotukhin I, Sakai Y, Loiler S, Fraites Jr TJ, Chiodo VA, Phillipsberg T, Muzyczka N, Hauswirth WW, Flotte TR, Byrne BJ, Snyder RO (2002) Production and purification of serotype 1, 2, and 5 recombinant adeno-associated viral vectors. Methods 28:158–167.

(Accepted 8 May 2012)
(Available online 18 May 2012)

ANNEXE 6

Séquences nucléotidiques des miR matures présumés identifiés par l'algorithme miRDeep2 dans le noyau du raphé dorsal, pour les groupes (A) et (B) de miR présentés dans le tableau 2.

A)

MiR présumé (coordonnées)	Séquence du miR mature présumé
chr17:25382489	ugagcaccaccccucucucaga
chr8:74993908	ucacccuggacugacucucagg
chr4:120645857	ucucacuguccucugcacuagg
chr12:33947684	ucagaacaaccugaccugccu
chr2:67513508	uccacugagaggaccacccaca
chr11:97007673	ucugacuucuugcuucucuccu
chr9:107428753	gucuguaaggcacugaccaccu
chrX:143433962	aggcugcaggcccacuucccu
chr9:72981988	uagugccccuguguucucuacuu
chr2:153243613	ucucccauagccugugucuccc

B)

MiR présumé (coordonnées)	Séquence du miR mature présumé
chr11:116938679	uuugcaguaacaggugguggacauc
chr10:80878979	ucaggcuacagagcgagaaccu
chr11:109522529	ugauaggacugagaaccugaga
chr4:46508090	uuggcugagggaaaugacugaau
chr12:103826766	cucaacuuccucugcccuaga
chr13:25071920	acagacgggcucucaugcugac
chr2:132536500	aacaccaggacugaaaacagccu
chr11:121248453	uuggaccgcacagauuuagacc
chr18:61113522	ggugagcucuugguaccuuggc

BIBLIOGRAPHIE

A

abrégés MASSON, 2003. Psychiatrie de l'enfant, de l'adolescent et de l'adulte, 1ère édition.

Achterberg, W., Pot, A.M., Kerkstra, A., Ribbe, M., 2006. Depressive symptoms in newly admitted nursing home residents. Int J Geriatr Psychiatry. 21, 1156-62.

Agence francaise de sécurité sanitaire des produits de santé, 2006. Bon usage des médicaments antidépresseurs dans le traitement des troubles dépressifs et des troubles anxieux de l'adulte.

Ahmadi, J., Ahmadi, K., 2003. Controlled trial of maintenance treatment of intravenous buprenorphine dependence. Ir J Med Sci. 172, 171-3.

Ahmadi, J., Ahmadi, K., Ohaeri, J., 2003. Controlled, randomized trial in maintenance treatment of intravenous buprenorphine dependence with naltrexone, methadone or buprenorphine: a novel study. Eur J Clin Invest. 33, 824-9.

Ahmed, S.H., Koob, G.F., 1998. Transition from moderate to excessive drug intake: change in hedonic set point. Science. 282, 298-300.

Ahmed, S.H., Walker, J.R., Koob, G.F., 2000. Persistent increase in the motivation to take heroin in rats with a history of drug escalation. Neuropsychopharmacology. 22, 413-21.

Akaoka, H., Aston-Jones, G., 1993. Indirect serotonergic agonists attenuate neuronal opiate withdrawal. Neuroscience. 54, 561-5.

Akil, H., Owens, C., Gutstein, H., Taylor, L., Curran, E., Watson, S., 1998. Endogenous opioids: overview and current issues. Drug Alcohol Depend. 51, 127-40.

Akimova, E., Lanzenberger, R., Kasper, S., 2009. The serotonin-1A receptor in anxiety disorders. Biol Psychiatry. 66, 627-35.

Alonso, J., Angermeyer, M.C., Bernert, S., Bruffaerts, R., Brugha, T.S., Bryson, H., de Girolamo, G., Graaf, R., Demyttenaere, K., Gasquet, I., Haro, J.M., Katz, S.J., Kessler, R.C., Kovess, V., Lepine, J.P., Ormel, J., Polidori, G., Russo, L.J., Vilagut, G., Almansa, J., Arbabzadeh-Bouchez, S., Autonell, J., Bernal, M., Buist-Bouwman, M.A., Codony, M., Domingo-Salvany, A., Ferrer, M., Joo, S.S., Martinez-Alonso, M., Matschinger, H., Mazzi, F., Morgan, Z., Morosini, P., Palacin, C., Romera, B., Taub, N., Vollebergh, W.A., 2004. Psychotropic drug utilization in Europe: results from the European Study of the Epidemiology of Mental Disorders (ESEMeD) project. Acta Psychiatr Scand Suppl. 55-64.

Alonso, J., Lepine, J.P., 2007. Overview of key data from the European Study of the Epidemiology of Mental Disorders (ESEMeD). J Clin Psychiatry. 68 Suppl 2, 3-9.

American Psychiatric Association - DSM-V development, 2010. http://www.dsm5.org/ProposedRevisions/Pages/proposedrevision.aspx?rid=431.

American Psychiatric Association, 1980. Diagnostic and statistical manual of mental disorders, third edition. Washington, DC: American Psychiatric Association.

American Psychiatric Association, 1994. Diagnostic and statistical manual of mental disorders, fourth edition. Washington, DC: American Psychiatric Association.

Ammon-Treiber, S., Hollt, V., 2005. Morphine-induced changes of gene expression in the brain. Addict Biol. 10, 81-9.

Anders, S., Huber, W., 2010. Differential expression analysis for sequence count data. Genome Biol. 11, R106.

Andersen, G., Sjogren, P., Hansen, S.H., Jensen, N.H., Christrup, L., 2004. Pharmacological consequences of long-term morphine treatment in patients with cancer and chronic non-malignant pain. Eur J Pain. 8, 263-71.

Andersen, J.M., Ripel, A., Boix, F., Normann, P.T., Morland, J., 2009. Increased locomotor activity induced by heroin in mice: pharmacokinetic demonstration of heroin acting as a prodrug for the mediator 6-monoacetylmorphine in vivo. J Pharmacol Exp Ther. 331, 153-61.

Anderson, I.M., Ferrier, I.N., Baldwin, R.C., Cowen, P.J., Howard, L., Lewis, G., Matthews, K., McAllister-Williams, R.H., Peveler, R.C., Scott, J., Tylee, A., 2008. Evidence-based guidelines for treating depressive disorders with antidepressants: a revision of the 2000 British Association for Psychopharmacology guidelines. J Psychopharmacol. 22, 343-96.

Anraku, T., Ikegaya, Y., Matsuki, N., Nishiyama, N., 2001. Withdrawal from chronic morphine administration causes prolonged enhancement of immobility in rat forced swimming test. Psychopharmacology (Berl). 157, 217-20.

Antonilli, L., Semeraro, F., Suriano, C., Signore, L., Nencini, P., 2003. High levels of morphine-6-glucuronide in street heroin addicts. Psychopharmacology (Berl). 170, 200-4.

Arndt, I.O., Dorozynsky, L., Woody, G.E., McLellan, A.T., O'Brien, C.P., 1992. Desipramine treatment of cocaine dependence in methadone-maintained patients. Arch Gen Psychiatry. 49, 888-93.

Aston-Jones, G., Harris, G.C., 2004. Review - Brain substrates for increased drug seeking during protracted withdrawal. Neuropharmacology. 47 Suppl 1, 167-79.

Autry, A.E., Adachi, M., Nosyreva, E., Na, E.S., Los, M.F., Cheng, P.F., Kavalali, E.T., Monteggia, L.M., 2011. NMDA receptor blockade at rest triggers rapid behavioural antidepressant responses. Nature.

Azar, M.R., Jones, B.C., Schulteis, G., 2003. Conditioned place aversion is a highly sensitive index of acute opioid dependence and withdrawal. Psychopharmacology (Berl). 170, 42-50.

B

Badiani, A., Belin, D., Epstein, D., Calu, D., Shaham, Y., 2011. Opiate versus psychostimulant addiction: the differences do matter. Nat Rev Neurosci. 12, 685-700.

Bagnol, D., Mansour, A., Akil, H., Watson, S.J., 1997. Cellular localization and distribution of the cloned mu and kappa opioid receptors in rat gastrointestinal tract. Neuroscience. 81, 579-91.

Bai, F., Li, X., Clay, M., Lindstrom, T., Skolnick, P., 2001. Intra- and interstrain differences in models of "behavioral despair". Pharmacol Biochem Behav. 70, 187-92.

Bak, M., Silahtaroglu, A., Moller, M., Christensen, M., Rath, M.F., Skryabin, B., Tommerup, N., Kauppinen, S., 2008. MicroRNA expression in the adult mouse central nervous system. RNA. 14, 432-44.

Barrett, S.P., Boileau, I., Okker, J., Pihl, R.O., Dagher, A., 2004. The hedonic response to cigarette smoking is proportional to dopamine release in the human striatum as measured by positron emission tomography and [11C]raclopride. Synapse. 54, 65-71.

Barrot, M., Olivier, J.D., Perrotti, L.I., DiLeone, R.J., Berton, O., Eisch, A.J., Impey, S., Storm, D.R., Neve, R.L., Yin, J.C., Zachariou, V., Nestler, E.J., 2002. CREB activity in the nucleus accumbens shell controls gating of behavioral responses to emotional stimuli. Proc Natl Acad Sci U S A. 99, 11435-40.

Baudry, A., Mouillet-Richard, S., Schneider, B., Launay, J.M., Kellermann, O., 2010. miR-16 targets the serotonin transporter: a new facet for adaptive responses to antidepressants. Science. 329, 1537-41.

Bauer, M., Whybrow, P.C., Angst, J., Versiani, M., Moller, H.J., 2002. World Federation of Societies of Biological Psychiatry (WFSBP) Guidelines for Biological Treatment of Unipolar Depressive Disorders, Part 1: Acute and continuation treatment of major depressive disorder. World J Biol Psychiatry. 3, 5-43.

Beck, S.G., Pan, Y.Z., Akanwa, A.C., Kirby, L.G., 2004. Median and dorsal raphe neurons are not electrophysiologically identical. J Neurophysiol. 91, 994-1005.

Becker, J.A., Befort, K., Blad, C., Filliol, D., Ghate, A., Dembele, D., Thibault, C., Koch, M., Muller, J., Lardenois, A., Poch, O., Kieffer, B.L., 2008. Transcriptome analysis identifies genes with enriched expression in the mouse central extended amygdala. Neuroscience. 156, 950-65.

Befort, K., Mattei, M.G., Roeckel, N., Kieffer, B., 1994. Chromosomal localization of the delta opioid receptor gene to human 1p34.3-p36.1 and mouse 4D bands by in situ hybridization. Genomics. 20, 143-5.

Befort, K., Filliol, D., Darcq, E., Ghate, A., Matifas, A., Lardenois, A., Muller, J., Thibault, C., Dembele, D., Poch, O., Kieffer, B.L., 2008a. Gene expression is altered in the lateral hypothalamus upon activation of the mu opioid receptor. Ann N Y Acad Sci. 1129, 175-84.

Befort, K., Filliol, D., Ghate, A., Darcq, E., Matifas, A., Muller, J., Lardenois, A., Thibault, C., Dembele, D., Le Merrer, J., Becker, J.A., Poch, O., Kieffer, B.L., 2008b. Mu-opioid receptor activation induces transcriptional plasticity in the central extended amygdala. Eur J Neurosci. 27, 2973-84.

Belin, D., Jonkman, S., Dickinson, A., Robbins, T.W., Everitt, B.J., 2009. Parallel and interactive learning processes within the basal ganglia: relevance for the understanding of addiction. Behav Brain Res. 199, 89-102.

Belmaker, R.H., Agam, G., 2008. Major depressive disorder. N Engl J Med. 358, 55-68.

Benbouzid, M., Gaveriaux-Ruff, C., Yalcin, I., Waltisperger, E., Tessier, L.H., Muller, A., Kieffer, B.L., Freund-Mercier, M.J., Barrot, M., 2008. Delta-opioid receptors are critical for tricyclic antidepressant treatment of neuropathic allodynia. Biol Psychiatry. 63, 633-6.

Berger, A.C., Whistler, J.L., 2011. Morphine-induced mu opioid receptor trafficking enhances reward yet prevents compulsive drug use. EMBO Mol Med. 3, 385-97.

Bergouignan, L., Lemogne, C., Foucher, A., Longin, E., Vistoli, D., Allilaire, J.F., Fossati, P., 2008. Field perspective deficit for positive memories characterizes autobiographical memory in euthymic depressed patients. Behav Res Ther. 46, 322-33.

Berrocoso, E., Mico, J.A., 2009. Cooperative opioid and serotonergic mechanisms generate superior antidepressant-like effects in a mice model of depression. Int J Neuropsychopharmacol. 12, 1033-44.

Berton, O., McClung, C.A., Dileone, R.J., Krishnan, V., Renthal, W., Russo, S.J., Graham, D., Tsankova, N.M., Bolanos, C.A., Rios, M., Monteggia, L.M., Self, D.W., Nestler, E.J., 2006. Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. Science. 311, 864-8.

Berton, O., Nestler, E.J., 2006. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. Nat Rev Neurosci. 7, 137-51.

Besse, D., Lombard, M.C., Besson, J.M., 1991. Autoradiographic distribution of mu, delta and kappa opioid binding sites in the superficial dorsal horn, over the rostrocaudal axis of the rat spinal cord. Brain Res. 548, 287-91.

Bijl, R.V., Ravelli, A., van Zessen, G., 1998. Prevalence of psychiatric disorder in the general population: results of The Netherlands Mental Health Survey and Incidence Study (NEMESIS). Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol. 33, 587-95.

Blatchford, K.E., Diamond, K., Westbrook, R.F., McNally, G.P., 2005. Increased vulnerability to stress following opiate exposures: behavioral and autonomic correlates. Behav Neurosci. 119, 1034-41.

Blatchford, K.E., Choi, E.A., McNally, G.P., 2006. Altered responsivity to central administrations of corticotropin-releasing factor in rats with a history of opiate exposures. Behav Neurosci. 120, 1169-74.

Bockaert, J., Pin, J.P., 1999. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. EMBO J. 18, 1723-9.

Bodnar, R.J., 2011. Endogenous opiates and behavior: 2010. Peptides. 32, 2522-52.

Boettiger, C.A., Kelley, E.A., Mitchell, J.M., D'Esposito, M., Fields, H.L., 2009. Now or Later? An fMRI study of the effects of endogenous opioid blockade on a decision-making network. Pharmacol Biochem Behav. 93, 291-9.

Bohren, Y., Karavelic, D., Tessier, L.H., Yalcin, I., Gaveriaux-Ruff, C., Kieffer, B.L., Freund-Mercier, M.J., Barrot, M., 2010. Mu-opioid receptors are not necessary for nortriptyline treatment of neuropathic allodynia. Eur J Pain. 14, 700-4.

Borrelli, E., Nestler, E.J., Allis, C.D., Sassone-Corsi, P., 2008. Decoding the epigenetic language of neuronal plasticity. Neuron. 60, 961-74.

Bostock, E., Gallagher, M., King, R.A., 1988. Effects of opioid microinjections into the medial septal area on spatial memory in rats. Behav Neurosci. 102, 643-52.

Bourdon, K.H., Rae, D.S., Locke, B.Z., Narrow, W.E., Regier, D.A., 1992. Estimating the prevalence of mental disorders in U.S. adults from the Epidemiologic Catchment Area Survey. Public Health Rep. 107, 663-8.

Bourin, M., Chenu, F., Ripoll, N., David, D.J., 2005. A proposal of decision tree to screen putative antidepressants using forced swim and tail suspension tests. Behav Brain Res. 164, 266-9.

Boyce-Rustay, J.M., Janos, A.L., Holmes, A., 2008. Effects of chronic swim stress on EtOH-related behaviors in C57BL/6J, DBA/2J and BALB/cByJ mice. Behav Brain Res. 186, 133-7.

Boyd, J.H., Burke, J.D., Jr., Gruenberg, E., Holzer, C.E., 3rd, Rae, D.S., George, L.K., Karno, M., Stoltzman, R., McEvoy, L., Nestadt, G., 1984. Exclusion criteria of DSM-III. A study of co-occurrence of hierarchy-free syndromes. Arch Gen Psychiatry. 41, 983-9.

Brewer, C., 2002. Serum naltrexone and 6-beta-naltrexol levels from naltrexone implants can block very large amounts of heroin: a report of two cases. Addict Biol. 7, 321-3.

Brewer, D.D., Catalano, R.F., Haggerty, K., Gainey, R.R., Fleming, C.B., 1998. A meta-analysis of predictors of continued drug use during and after treatment for opiate addiction. Addiction. 93, 73-92.

Brown, P., Molliver, M.E., 2000. Dual serotonin (5-HT) projections to the nucleus accumbens core and shell: relation of the 5-HT transporter to amphetamine-induced neurotoxicity. J Neurosci. 20, 1952-63.

Bruchas, M.R., Chavkin, C., 2010. Kinase cascades and ligand-directed signaling at the kappa opioid receptor. Psychopharmacology (Berl). 210, 137-47.

Buckman, S.G., Hodgson, S.R., Hofford, R.S., Eitan, S., 2009. Increased elevated plus maze open-arm time in mice during spontaneous morphine withdrawal. Behav Brain Res. 197, 454-6.

Burt, D.B., Zembar, M.J., Niederehe, G., 1995. Depression and memory impairment: a meta-analysis of the association, its pattern, and specificity. Psychol Bull. 117, 285-305.

C

Caille, S., Espejo, E.F., Reneric, J.P., Cador, M., Koob, G.F., Stinus, L., 1999. Total neurochemical lesion of noradrenergic neurons of the locus ceruleus does not alter either naloxone-precipitated or spontaneous opiate withdrawal nor does it influence ability of clonidine to reverse opiate withdrawal. J Pharmacol Exp Ther. 290, 881-92.

Caille, S., Espejo, E.F., Koob, G.F., Stinus, L., 2002. Dorsal and median raphe serotonergic system lesion does not alter the opiate withdrawal syndrome. Pharmacol Biochem Behav. 72, 979-86.

Caille, S., Rodriguez-Arias, M., Minarro, J., Espejo, E.F., Cador, M., Stinus, L., 2003a. Changes in dopaminergic neurotransmission do not alter somatic or motivational opiate withdrawal-induced symptoms in rats. Behav Neurosci. 117, 995-1005.

Caille, S., Stinus, L., Espejo, E.F., De Deurwaerdere, P., Spampinato, U., Koob, G.F., 2003b. Inhibition of 5-HT neurotransmission increases clonidine protective effects on naloxone-

induced conditioned place aversion in morphine-dependent rats. Neuropsychopharmacology. 28, 276-83.

Campbell, S., Marriott, M., Nahmias, C., MacQueen, G.M., 2004. Lower hippocampal volume in patients suffering from depression: a meta-analysis. Am J Psychiatry. 161, 598-607.

Cape, J., Barker, C., Buszewicz, M., Pistrang, N., 2000a. General practitioner psychological management of common emotional problems (II): A research agenda for the development of evidence-based practice. Br J Gen Pract. 50, 396-400.

Cape, J., Barker, C., Buszewicz, M., Pistrang, N., 2000b. General practitioner psychological management of common emotional problems (I): Definitions and literature review. Br J Gen Pract. 50, 313-8.

Caplehorn, J.R., Dalton, M.S., Haldar, F., Petrenas, A.M., Nisbet, J.G., 1996. Methadone maintenance and addicts' risk of fatal heroin overdose. Subst Use Misuse. 31, 177-96.

Carpenter, K.M., Brooks, A.C., Vosburg, S.K., Nunes, E.V., 2004. The effect of sertraline and environmental context on treating depression and illicit substance use among methadone maintained opiate dependent patients: a controlled clinical trial. Drug Alcohol Depend. 74, 123-34.

Carroll, M.E., Campbell, U.C., Heideman, P., 2001. Ketoconazole suppresses food restriction-induced increases in heroin self-administration in rats: sex differences. Exp Clin Psychopharmacol. 9, 307-16.

Caspi, A., Sugden, K., Moffitt, T.E., Taylor, A., Craig, I.W., Harrington, H., McClay, J., Mill, J., Martin, J., Braithwaite, A., Poulton, R., 2003. Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. Science. 301, 386-9.

Castilho, V.M., Borelli, K.G., Brandao, M.L., Nobre, M.J., 2008. Anxiety-like symptoms induced by morphine withdrawal may be due to the sensitization of the dorsal periaqueductal grey. Physiol Behav. 94, 552-62.

Cerda, M., Sagdeo, A., Galea, S., 2008. Comorbid forms of psychopathology: key patterns and future research directions. Epidemiol Rev. 30, 155-77.

Chao, J., Nestler, E.J., 2004. Molecular neurobiology of drug addiction. Annu Rev Med. 55, 113-32.

Chaturvedi, K., Christoffers, K.H., Singh, K., Howells, R.D., 2000. Structure and regulation of opioid receptors. Biopolymers. 55, 334-46.

Chefer, V.I., Shippenberg, T.S., 2009. Augmentation of morphine-induced sensitization but reduction in morphine tolerance and reward in delta-opioid receptor knockout mice. Neuropsychopharmacology. 34, 887-98.

Chieng, B., Christie, M.J., 2009. Chronic morphine treatment induces functional delta-opioid receptors in amygdala neurons that project to periaqueductal grey. Neuropharmacology. 57, 430-7.

Childress, A.R., Ehrman, R., McLellan, A.T., MacRae, J., Natale, M., O'Brien, C.P., 1994. Can induced moods trigger drug-related responses in opiate abuse patients? J Subst Abuse Treat. 11, 17-23.

Childress, A.R., Mozley, P.D., McElgin, W., Fitzgerald, J., Reivich, M., O'Brien, C.P., 1999. Limbic activation during cue-induced cocaine craving. Am J Psychiatry. 156, 11-8.

Christensen, H., Griffiths, K., Mackinnon, A., Jacomb, P., 1997. A quantitative review of cognitive deficits in depression and Alzheimer-type dementia. J Int Neuropsychol Soc. 3, 631-51.

Chuang, T.K., Killam, K.F., Jr., Chuang, L.F., Kung, H.F., Sheng, W.S., Chao, C.C., Yu, L., Chuang, R.Y., 1995. Mu opioid receptor gene expression in immune cells. Biochem Biophys Res Commun. 216, 922-30.

Comb, M., Seeburg, P.H., Adelman, J., Eiden, L., Herbert, E., 1982. Primary structure of the human Met- and Leu-enkephalin precursor and its mRNA. Nature. 295, 663-6.

Compton, W.M., Thomas, Y.F., Stinson, F.S., Grant, B.F., 2007. Prevalence, correlates, disability, and comorbidity of DSM-IV drug abuse and dependence in the United States: results from the

national epidemiologic survey on alcohol and related conditions. Arch Gen Psychiatry. 64, 566-76.

Conner, K.R., Pinquart, M., Duberstein, P.R., 2008. Meta-analysis of depression and substance use and impairment among intravenous drug users (IDUs). Addiction. 103, 524-34.

Connock, M., Juarez-Garcia, A., Jowett, S., Frew, E., Liu, Z., Taylor, R.J., Fry-Smith, A., Day, E., Lintzeris, N., Roberts, T., Burls, A., Taylor, R.S., 2007. Methadone and buprenorphine for the management of opioid dependence: a systematic review and economic evaluation. Health Technol Assess. 11, 1-171, iii-iv.

Contet, C., Kieffer, B.L., Befort, K., 2004. Mu opioid receptor: a gateway to drug addiction. Curr Opin Neurobiol. 14, 370-8.

Costello, E.J., Mustillo, S., Erkanli, A., Keeler, G., Angold, A., 2003. Prevalence and development of psychiatric disorders in childhood and adolescence. Arch Gen Psychiatry. 60, 837-44.

Covington, H.E., 3rd, Miczek, K.A., 2001. Repeated social-defeat stress, cocaine or morphine. Effects on behavioral sensitization and intravenous cocaine self-administration "binges". Psychopharmacology (Berl). 158, 388-98.

Cruz, F.C., Quadros, I.M., Hogenelst, K., Planeta, C.S., Miczek, K.A., 2011. Social defeat stress in rats: escalation of cocaine and "speedball" binge self-administration, but not heroin. Psychopharmacology (Berl).

Cryan, J.F., Mombereau, C., 2004. In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. Mol Psychiatry. 9, 326-57.

Cryan, J.F., Holmes, A., 2005. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. Nat Rev Drug Discov. 4, 775-90.

Cryan, J.F., Mombereau, C., Vassout, A., 2005. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. Neurosci Biobehav Rev. 29, 571-625.

D

Dahlstroem, A., Fuxe, K., 1964. Evidence for the Existence of Monoamine-Containing Neurons in the Central Nervous System. I. Demonstration of Monoamines in the Cell Bodies of Brain Stem Neurons. Acta Physiol Scand Suppl. SUPPL 232:1-55.

Darcq, E., Koebel, P., Del Boca, C., Pannetier, S., Kirstetter, A.S., Garnier, J.M., Hanauer, A., Befort, K., Kieffer, B.L., 2011. RSK2 signaling in brain habenula contributes to place aversion learning. Learn Mem. 18, 574-8.

Darcq, E., Befort, K., Koebel, P., Pannetier, S., Mahoney, M.K., Gaveriaux-Ruff, C., Hanauer, A., Kieffer, B.L., 2012. RSK2 signaling in medial habenula contributes to acute morphine analgesia. Neuropsychopharmacology. 37, 1288-96.

Darke, S., Ross, J., 2002. Suicide among heroin users: rates, risk factors and methods. Addiction. 97, 1383-94.

David, D.J., Samuels, B.A., Rainer, Q., Wang, J.W., Marsteller, D., Mendez, I., Drew, M., Craig, D.A., Guiard, B.P., Guilloux, J.P., Artymyshyn, R.P., Gardier, A.M., Gerald, C., Antonijevic, I.A., Leonardo, E.D., Hen, R., 2009. Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. Neuron. 62, 479-93.

Davidson, R.J., 1998. Affective style and affective disorders: perspectives from affective neuroscience. Cognition and emotion. 12, 307-330.

Day, R., Trujillo, K.A., Akil, A., 1993. Prodynorphin biosynthesis and posttranslational processing. In: Opioids I, Handbook of Experimental Pharmacology. Vol. 1O4/1, A. Herz, ed.^eds. Springer-Verlag, Berlin, pp. 449-463.

de Graaf, R., Bijl, R.V., Ten Have, M., Beekman, A.T., Vollebergh, W.A., 2004. Pathways to comorbidity: the transition of pure mood, anxiety and substance use disorders into comorbid conditions in a longitudinal population-based study. J Affect Disord. 82, 461-7.

de Wied, D., 1990. Neurotrophic effects of ACTH/MSH neuropeptides. Acta Neurobiol Exp (Wars). 50, 353-66.

Deakin, J.F., Dostrovsky, J.O., Smyth, D.G., 1980. Influence of N-terminal acetylation and C-terminal proteolysis on the analgesic activity of beta-endorphin. Biochem J. 189, 501-6.

Dean, A.J., Bell, J., Mascord, D.J., Parker, G., Christie, M.J., 2002. A randomised, controlled trial of fluoxetine in methadone maintenance patients with depressive symptoms. J Affect Disord. 72, 85-90.

Decaillot, F.M., Befort, K., Filliol, D., Yue, S., Walker, P., Kieffer, B.L., 2003. Opioid receptor random mutagenesis reveals a mechanism for G protein-coupled receptor activation. Nat Struct Biol. 10, 629-36.

Delfs, J.M., Zhu, Y., Druhan, J.P., Aston-Jones, G., 2000. Noradrenaline in the ventral forebrain is critical for opiate withdrawal-induced aversion. Nature. 403, 430-4.

Deneris, E.S., Wyler, S.C., 2012. Serotonergic transcriptional networks and potential importance to mental health. Nat Neurosci.

DePaoli, A.M., Hurley, K.M., Yasada, K., Reisine, T., Bell, G., 1994. Distribution of kappa opioid receptor mRNA in adult mouse brain: an in situ hybridization histochemistry study. Mol Cell Neurosci. 5, 327-35.

Deroche-Gamonet, V., Belin, D., Piazza, P.V., 2004. Evidence for addiction-like behavior in the rat. Science. 305, 1014-7.

Di Chiara, G., 1999. Drug addiction as dopamine-dependent associative learning disorder. Eur J Pharmacol. 375, 13-30.

Diana, M., Pistis, M., Muntoni, A., Gessa, G., 1995. Profound decrease of mesolimbic dopaminergic neuronal activity in morphine withdrawn rats. J Pharmacol Exp Ther. 272, 781-5.

Diaz, S.L., Doly, S., Narboux-Neme, N., Fernandez, S., Mazot, P., Banas, S.M., Boutourlinsky, K., Moutkine, I., Belmer, A., Roumier, A., Maroteaux, L., 2012. 5-HT(2B) receptors are required for serotonin-selective antidepressant actions. Mol Psychiatry. 17, 154-63.

Dixit, A.R., Crum, R.M., 2000. Prospective study of depression and the risk of heavy alcohol use in women. Am J Psychiatry. 157, 751-8.

Doyle, J.P., Dougherty, J.D., Heiman, M., Schmidt, E.F., Stevens, T.R., Ma, G., Bupp, S., Shrestha, P., Shah, R.D., Doughty, M.L., Gong, S., Greengard, P., Heintz, N., 2008. Application of a translational profiling approach for the comparative analysis of CNS cell types. Cell. 135, 749-62.

E

Einat, H., Szechtman, H., 1995. Perseveration without hyperlocomotion in a spontaneous alternation task in rats sensitized to the dopamine agonist quinpirole. Physiol Behav. 57, 55-9.

Eisch, A.J., Barrot, M., Schad, C.A., Self, D.W., Nestler, E.J., 2000. Opiates inhibit neurogenesis in the adult rat hippocampus. Proc Natl Acad Sci U S A. 97, 7579-84.

Eisenberger, N.I., 2012. The pain of social disconnection: examining the shared neural underpinnings of physical and social pain. Nat Rev Neurosci.

el-Kadi, A.O., Sharif, S.I., 1994. The influence of various experimental conditions on the expression of naloxone-induced withdrawal symptoms in mice. Gen Pharmacol. 25, 1505-10.

Enquist, J., Ferwerda, M., Milan-Lobo, L., Whistler, J.L., 2012. Chronic methadone treatment shows a better cost/benefit ratio than chronic morphine in mice. J Pharmacol Exp Ther. 340, 386-92.

European monitoring centre for drugs and drug addiction, 2010. Trends in injecting drug use in Europe. Selected issue.

Evans, C.J., Keith, D.E., Jr., Morrison, H., Magendzo, K., Edwards, R.H., 1992. Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. Science. 258, 1952-5.

F

Fadda, P., Scherma, M., Fresu, A., Collu, M., Fratta, W., 2005. Dopamine and serotonin release in dorsal striatum and nucleus accumbens is differentially modulated by morphine in DBA/2J and C57BL/6J mice. Synapse. 56, 29-38.

Fallon, J.H., Leslie, F.M., 1986. Distribution of dynorphin and enkephalin peptides in the rat brain. J Comp Neurol. 249, 293-336.

Fareed, A., Casarella, J., Roberts, M., Sleboda, M., Amar, R., Vayalapalli, S., Drexler, K., 2009. High dose versus moderate dose methadone maintenance: is there a better outcome? J Addict Dis. 28, 399-405.

Ferguson, S.A., Boctor, S.Y., 2010. Cocaine responsiveness or anhedonia in rats treated with methylphenidate during adolescence. Neurotoxicol Teratol.

Ferrari, A., Coccia, C.P., Bertolini, A., Sternieri, E., 2004. Methadone--metabolism, pharmacokinetics and interactions. Pharmacol Res. 50, 551-9.

File, S.E., Hyde, J.R., 1978. Can social interaction be used to measure anxiety? Br J Pharmacol. 62, 19-24.

File, S.E., Seth, P., 2003. A review of 25 years of the social interaction test. Eur J Pharmacol. 463, 35-53.

Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N., Sonenberg, N., 2008. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? Nat Rev Genet. 9, 102-14.

Filliol, D., Ghozland, S., Chluba, J., Martin, M., Matthes, H.W., Simonin, F., Befort, K., Gaveriaux-Ruff, C., Dierich, A., LeMeur, M., Valverde, O., Maldonado, R., Kieffer, B.L., 2000. Mice deficient for delta- and mu-opioid receptors exhibit opposing alterations of emotional responses. Nat Genet. 25, 195-200.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. Nature. 391, 806-11.

Fischer, S.J., Arguello, A.A., Charlton, J.J., Fuller, D.C., Zachariou, V., Eisch, A.J., 2008. Morphine blood levels, dependence, and regulation of hippocampal subgranular zone proliferation rely on administration paradigm. Neuroscience. 151, 1217-24.

Foltin, R.W., Fischman, M.W., 1996. Effects of methadone or buprenorphine maintenance on the subjective and reinforcing effects of intravenous cocaine in humans. J Pharmacol Exp Ther. 278, 1153-64.

Fossati, P., Coyette, F., Ergis, A.M., Allilaire, J.F., 2002. Influence of age and executive functioning on verbal memory of inpatients with depression. J Affect Disord. 68, 261-71.

Fossati, P., Harvey, P.O., Le Bastard, G., Ergis, A.M., Jouvent, R., Allilaire, J.F., 2004a. Verbal memory performance of patients with a first depressive episode and patients with unipolar and bipolar recurrent depression. J Psychiatr Res. 38, 137-44.

Fossati, P., Radtchenko, A., Boyer, P., 2004b. Neuroplasticity: from MRI to depressive symptoms. Eur Neuropsychopharmacol. 14 Suppl 5, S503-10.

Francis, D., Diorio, J., Liu, D., Meaney, M.J., 1999. Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat. Science. 286, 1155-8.

Frank, B., 2000. An overview of heroin trends in New York City: past, present and future. Mt Sinai J Med. 67, 340-6.

Fredriksson, R., Lagerstrom, M.C., Lundin, L.G., Schioth, H.B., 2003. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. Mol Pharmacol. 63, 1256-72.

Friedlander, M.R., Chen, W., Adamidi, C., Maaskola, J., Einspanier, R., Knespel, S., Rajewsky, N., 2008. Discovering microRNAs from deep sequencing data using miRDeep. Nat Biotechnol. 26, 407-15.

Friedlander, M.R., Mackowiak, S.D., Li, N., Chen, W., Rajewsky, N., 2012. miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. Nucleic Acids Res. 40, 37-52.

Frodl, T., Schaub, A., Banac, S., Charypar, M., Jager, M., Kummler, P., Bottlender, R., Zetzsche, T., Born, C., Leinsinger, G., Reiser, M., Moller, H.J., Meisenzahl, E.M., 2006. Reduced hippocampal volume correlates with executive dysfunctioning in major depression. J Psychiatry Neurosci. 31, 316-23.

Fudala, P.J., Bridge, T.P., Herbert, S., Williford, W.O., Chiang, C.N., Jones, K., Collins, J., Raisch, D., Casadonte, P., Goldsmith, R.J., Ling, W., Malkerneker, U., McNicholas, L., Renner, J., Stine, S., Tusel, D., 2003. Office-based treatment of opiate addiction with a sublingual-tablet formulation of buprenorphine and naloxone. N Engl J Med. 349, 949-58.

G

Gaspar, P., Cases, O., Maroteaux, L., 2003. The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. Nat Rev Neurosci. 4, 1002-12.

Gaveriaux-Ruff, C., Kieffer, B.L., 2007. Conditional gene targeting in the mouse nervous system: Insights into brain function and diseases. Pharmacol Ther. 113, 619-34.

Gaveriaux, C., Peluso, J., Simonin, F., Laforet, J., Kieffer, B., 1995. Identification of kappa- and delta-opioid receptor transcripts in immune cells. FEBS Lett. 369, 272-6.

Gelernter, J., Gueorguieva, R., Kranzler, H.R., Zhang, H., Cramer, J., Rosenheck, R., Krystal, J.H., 2007. Opioid receptor gene (OPRM1, OPRK1, and OPRD1) variants and response to naltrexone treatment for alcohol dependence: results from the VA Cooperative Study. Alcohol Clin Exp Res. 31, 555-63.

Gerra, G., Marcato, A., Caccavari, R., Fontanesi, B., Delsignore, R., Fertonani, G., Avanzini, P., Rustichelli, P., Passeri, M., 1995. Clonidine and opiate receptor antagonists in the treatment of heroin addiction. J Subst Abuse Treat. 12, 35-41.

Gerra, G., Borella, F., Zaimovic, A., Moi, G., Bussandri, M., Bubici, C., Bertacca, S., 2004. Buprenorphine versus methadone for opioid dependence: predictor variables for treatment outcome. Drug Alcohol Depend. 75, 37-45.

Gerra, G., Fantoma, A., Zaimovic, A., 2006. Naltrexone and buprenorphine combination in the treatment of opioid dependence. J Psychopharmacol. 20, 806-14.

Ghate, A., Befort, K., Becker, J.A., Filliol, D., Bole-Feysot, C., Demebele, D., Jost, B., Koch, M., Kieffer, B.L., 2007. Identification of novel striatal genes by expression profiling in adult mouse brain. Neuroscience. 146, 1182-92.

Giacomuzzi, S.M., Riemer, Y., Ertl, M., Kemmler, G., Rossler, H., Hinterhuber, H., Kurz, M., 2003. Buprenorphine versus methadone maintenance treatment in an ambulant setting: a health-related quality of life assessment. Addiction. 98, 693-702.

Gilbert, R., Widom, C.S., Browne, K., Fergusson, D., Webb, E., Janson, S., 2009. Burden and consequences of child maltreatment in high-income countries. Lancet. 373, 68-81.

Glickman, S.E., Schiff, B.B., 1967. A biological theory of reinforcement. Psychol Rev. 74, 81-109.

Goeders, N.E., 2003. The impact of stress on addiction. Eur Neuropsychopharmacol. 13, 435-41.

Goldstein, A., Tachibana, S., Lowney, L.I., Hunkapiller, M., Hood, L., 1979. Dynorphin-(1-13), an extraordinarily potent opioid peptide. Proc Natl Acad Sci U S A. 76, 6666-70.

Goodman, W.K., 2004. Selecting pharmacotherapy for generalized anxiety disorder. J Clin Psychiatry. 65 Suppl 13, 8-13.

Goody, R.J., Oakley, S.M., Filliol, D., Kieffer, B.L., Kitchen, I., 2002. Quantitative autoradiographic mapping of opioid receptors in the brain of delta-opioid receptor gene knockout mice. Brain Res. 945, 9-19.

Gorwood, P., Corruble, E., Falissard, B., Goodwin, G.M., 2008. Toxic effects of depression on brain function: impairment of delayed recall and the cumulative length of depressive disorder in a large sample of depressed outpatients. Am J Psychiatry. 165, 731-9.

Goudemand, M., 2010. Les états dépressifs. Lavoisier - Médecine Sciences Publications

Goumon, Y., Stefano, G.B., 2000. Identification of morphine in the rat adrenal gland. Brain Res Mol Brain Res. 77, 267-9.

Goumon, Y., Muller, A., Glattard, E., Marban, C., Gasnier, C., Strub, J.M., Chasserot-Golaz, S., Rohr, O., Stefano, G.B., Welters, I.D., Van Dorsselaer, A., Schoentgen, F., Aunis, D., Metz-Boutigue, M.H., 2006. Identification of morphine-6-glucuronide in chromaffin cell secretory granules. J Biol Chem. 281, 8082-9.

Graeff, F.G., 2004. Serotonin, the periaqueductal gray and panic. Neurosci Biobehav Rev. 28, 239-59.

Grant, B.F., Stinson, F.S., Harford, T.C., 2001. Age at onset of alcohol use and DSM-IV alcohol abuse and dependence: a 12-year follow-up. J Subst Abuse. 13, 493-504.

Grant, B.F., Dawson, D.A., Stinson, F.S., Chou, S.P., Dufour, M.C., Pickering, R.P., 2004a. The 12-month prevalence and trends in DSM-IV alcohol abuse and dependence: United States, 1991-1992 and 2001-2002. Drug Alcohol Depend. 74, 223-34.

Grant, B.F., Stinson, F.S., Dawson, D.A., Chou, S.P., Dufour, M.C., Compton, W., Pickering, R.P., Kaplan, K., 2004b. Prevalence and co-occurrence of substance use disorders and independent mood and anxiety disorders: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. Arch Gen Psychiatry. 61, 807-16.

Grant, B.F., Goldstein, R.B., Chou, S.P., Huang, B., Stinson, F.S., Dawson, D.A., Saha, T.D., Smith, S.M., Pulay, A.J., Pickering, R.P., Ruan, W.J., Compton, W.M., 2009. Sociodemographic and psychopathologic predictors of first incidence of DSM-IV substance use, mood and anxiety disorders: results from the Wave 2 National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. Mol Psychiatry. 14, 1051-66.

Grasing, K., Wang, A., Schlussman, S., 1996. Behavioral measures of anxiety during opiate withdrawal. Behav Brain Res. 80, 195-201.

Grasing, K., Ghosh, S., 1998. Selegiline prevents long-term changes in dopamine efflux and stress immobility during the second and third weeks of abstinence following opiate withdrawal. Neuropharmacology. 37, 1007-17.

Grauer, S.M., Tao, R., Auerbach, S.B., 1992. Morphine induces an increase in extracellular serotonin in the rat diencephalon. Brain Res. 599, 277-82.

Gray, A.M., 2002. The effect of fluvoxamine and sertraline on the opioid withdrawal syndrome: a combined in vivo cerebral microdialysis and behavioural study. Eur Neuropsychopharmacol. 12, 245-54.

Graziani, M., Antonilli, L., Togna, A.R., Brusadin, V., Viola, S., Togna, G., Badiani, A., Nencini, P., 2008. Non-opioid induction of morphine-6-glucuronide synthesis is elicited by prolonged exposure of rat hepatocytes to heroin. Drug Alcohol Depend. 98, 179-84.

Grella, C.E., Karno, M.P., Warda, U.S., Niv, N., Moore, A.A., 2009. Gender and comorbidity among individuals with opioid use disorders in the NESARC study. Addict Behav. 34, 498-504.

Grobe, N., Lamshoft, M., Orth, R.G., Drager, B., Kutchan, T.M., Zenk, M.H., Spiteller, M., 2010. Urinary excretion of morphine and biosynthetic precursors in mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 107, 8147-52.

Gronbladh, L., Ohlund, L.S., Gunne, L.M., 1990. Mortality in heroin addiction: impact of methadone treatment. Acta Psychiatr Scand. 82, 223-7.

H

Hack, S.P., Bagley, E.E., Chieng, B.C., Christie, M.J., 2005. Induction of delta-opioid receptor function in the midbrain after chronic morphine treatment. J Neurosci. 25, 3192-8.

Handal, M., Grung, M., Skurtveit, S., Ripel, A., Morland, J., 2002. Pharmacokinetic differences of morphine and morphine-glucuronides are reflected in locomotor activity. Pharmacol Biochem Behav. 73, 883-92.

Harburg, G.C., Hall, F.S., Harrist, A.V., Sora, I., Uhl, G.R., Eisch, A.J., 2007. Knockout of the mu opioid receptor enhances the survival of adult-generated hippocampal granule cell neurons. Neuroscience. 144, 77-87.

Harlan, R.E., Shivers, B.D., Romano, G.J., Howells, R.D., Pfaff, D.W., 1987. Localization of preproenkephalin mRNA in the rat brain and spinal cord by in situ hybridization. J Comp Neurol. 258, 159-84.

Harris, G.C., Aston-Jones, G., 1993a. Beta-adrenergic antagonists attenuate somatic and aversive signs of opiate withdrawal. Neuropsychopharmacology. 9, 303-11.

Harris, G.C., Aston-Jones, G., 1993b. Beta-adrenergic antagonists attenuate withdrawal anxiety in cocaine- and morphine-dependent rats. Psychopharmacology (Berl). 113, 131-6.

Harris, G.C., Aston-Jones, G., 2001. Augmented accumbal serotonin levels decrease the preference for a morphine associated environment during withdrawal. Neuropsychopharmacology. 24, 75-85.

Harris, G.C., Aston-Jones, G., 2003. Altered motivation and learning following opiate withdrawal: evidence for prolonged dysregulation of reward processing. Neuropsychopharmacology. 28, 865-71.

Harris, G.C., Aston-Jones, G., 2007. Activation in extended amygdala corresponds to altered hedonic processing during protracted morphine withdrawal. Behav Brain Res. 176, 251-8.

Hasin, D.S., Beseler, C.L., 2009. Dimensionality of lifetime alcohol abuse, dependence and binge drinking. Drug Alcohol Depend. 101, 53-61.

Haute autorité de santé, 2004. Stratégies thérapeutiques pour les personnes dépendantes des opiacés: place des traitements de substitution Conférence de consensus.

Hayatbakhsh, M.R., Najman, J.M., Jamrozik, K., Mamun, A.A., Alati, R., Bor, W., 2007. Cannabis and anxiety and depression in young adults: a large prospective study. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry. 46, 408-17.

He, M., Liu, Y., Wang, X., Zhang, M.Q., Hannon, G.J., Huang, Z.J., 2012. Cell-Type-Based Analysis of MicroRNA Profiles in the Mouse Brain. Neuron. 73, 35-48.

He, Y., Yang, C., Kirkmire, C.M., Wang, Z.J., 2010. Regulation of Opioid Tolerance by let-7 Family MicroRNA Targeting the {micro} Opioid Receptor. J Neurosci. 30, 10251-8.

Heiman, M., Schaefer, A., Gong, S., Peterson, J.D., Day, M., Ramsey, K.E., Suarez-Farinas, M., Schwarz, C., Stephan, D.A., Surmeier, D.J., Greengard, P., Heintz, N., 2008. A translational profiling approach for the molecular characterization of CNS cell types. Cell. 135, 738-48.

Henry, C., Van den Bulke, D., Bellivier, F., Roy, I., Swendsen, J., M'Bailara, K., Siever, L.J., Leboyer, M., 2008. Affective lability and affect intensity as core dimensions of bipolar disorders during euthymic period. Psychiatry Res. 159, 1-6.

Hensler, J.G., 2003. Regulation of 5-HT1A receptor function in brain following agonist or antidepressant administration. Life Sci. 72, 1665-82.

Hensler, J.G., 2006. Serotonergic modulation of the limbic system. Neurosci Biobehav Rev. 30, 203-14.

Hersh, L.B., 1984. Reaction of opioid peptides with neutral endopeptidase ("enkephalinase"). J Neurochem. 43, 487-93.

Hiramatsu, M., Hoshino, T., Kameyama, T., Nabeshima, T., 2002. Involvement of kappa-opioid and sigma receptors in short-term memory in mice. Eur J Pharmacol. 453, 91-8.

Hodgson, S.R., Hofford, R.S., Wellman, P.J., Eitan, S., 2009. Different affective response to opioid withdrawal in adolescent and adult mice. Life Sci. 84, 52-60.

Hofer, M.A., 1970. Physiological responses of infant rats to separation from their mothers. Science. 168, 871-3.

Holick, K.A., Lee, D.C., Hen, R., Dulawa, S.C., 2008. Behavioral effects of chronic fluoxetine in BALB/cJ mice do not require adult hippocampal neurogenesis or the serotonin 1A receptor. Neuropsychopharmacology. 33, 406-17.

Houshyar, H., Gomez, F., Manalo, S., Bhargava, A., Dallman, M.F., 2003. Intermittent morphine administration induces dependence and is a chronic stressor in rats. Neuropsychopharmacology. 28, 1960-72.

Hulse, G.K., Morris, N., Arnold-Reed, D., Tait, R.J., 2009. Improving clinical outcomes in treating heroin dependence: randomized, controlled trial of oral or implant naltrexone. Arch Gen Psychiatry. 66, 1108-15.

Hyman, S.E., 2005. Addiction: a disease of learning and memory. Am J Psychiatry. 162, 1414-22.

I

Institut national de prévention et d'éducation pour la santé 2005. La dépression en France, enquête ANADEP.

Inturrisi, C.E., 2002. Clinical pharmacology of opioids for pain. Clin J Pain. 18, S3-13.

Irazusta, J., Larrinaga, G., Agirregoitia, N., Varona, A., Casis, L., 2003. Effects of morphine administration and its withdrawal on rat brain aminopeptidase activities. Regul Pept. 110, 225-30.

Itoh, J., Ukai, M., Kameyama, T., 1994. Dynorphin A-(1-13) potently improves the impairment of spontaneous alternation performance induced by the mu-selective opioid receptor agonist DAMGO in mice. J Pharmacol Exp Ther. 269, 15-21.

J

Jacobsen, L.K., Southwick, S.M., Kosten, T.R., 2001. Substance use disorders in patients with posttraumatic stress disorder: a review of the literature. Am J Psychiatry. 158, 1184-90.

Jalabert, M., Bourdy, R., Courtin, J., Veinante, P., Manzoni, O.J., Barrot, M., Georges, F., 2011. Neuronal circuits underlying acute morphine action on dopamine neurons. Proc Natl Acad Sci U S A. 108, 16446-50.

Jenkins, R., Lewis, G., Bebbington, P., Brugha, T., Farrell, M., Gill, B., Meltzer, H., 1997. The National Psychiatric Morbidity surveys of Great Britain--initial findings from the household survey. Psychol Med. 27, 775-89.

Jentsch, J.D., Taylor, J.R., 1999. Impulsivity resulting from frontostriatal dysfunction in drug abuse: implications for the control of behavior by reward-related stimuli. Psychopharmacology (Berl). 146, 373-90.

Joe, G.W., Simpson, D.D., Broome, K.M., 1999. Retention and patient engagement models for different treatment modalities in DATOS. Drug Alcohol Depend. 57, 113-25.

Johnson, E.E., Christie, M.J., Connor, M., 2005. The role of opioid receptor phosphorylation and trafficking in adaptations to persistent opioid treatment. Neurosignals. 14, 290-302.

Jolas, T., Aghajanian, G.K., 1997. Opioids suppress spontaneous and NMDA-induced inhibitory postsynaptic currents in the dorsal raphe nucleus of the rat in vitro. Brain Res. 755, 229-45.

Jolas, T., Nestler, E.J., Aghajanian, G.K., 2000. Chronic morphine increases GABA tone on serotonergic neurons of the dorsal raphe nucleus: association with an up-regulation of the cyclic AMP pathway. Neuroscience. 95, 433-43.

Jones, S., Bonci, A., 2005. Synaptic plasticity and drug addiction. Curr Opin Pharmacol. 5, 20-5.

Jongkamonwiwat, N., Phansuwan-Pujito, P., Sarapoke, P., Chetsawang, B., Casalotti, S.O., Forge, A., Dodson, H., Govitrapong, P., 2003. The presence of opioid receptors in rat inner ear. Hear Res. 181, 85-93.

Juhila, J., Sipila, T., Icay, K., Nicorici, D., Ellonen, P., Kallio, A., Korpelainen, E., Greco, D., Hovatta, I., 2011. MicroRNA expression profiling reveals miRNA families regulating specific biological pathways in mouse frontal cortex and hippocampus. PLoS One. 6, e21495.

Jutkiewicz, E.M., 2006. The antidepressant -like effects of delta-opioid receptor agonists. Mol Interv. 6, 162-9.

K

Kahn, L., Alonso, G., Normand, E., Manzoni, O.J., 2005. Repeated morphine treatment alters polysialylated neural cell adhesion molecule, glutamate decarboxylase-67 expression and cell proliferation in the adult rat hippocampus. Eur J Neurosci. 21, 493-500.

Kakidani, H., Furutani, Y., Takahashi, H., Noda, M., Morimoto, Y., Hirose, T., Asai, M., Inayama, S., Nakanishi, S., Numa, S., 1982. Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine beta-neo-endorphin/dynorphin precursor. Nature. 298, 245-9.

Kakko, J., von Wachenfeldt, J., Svanborg, K.D., Lidstrom, J., Barr, C.S., Heilig, M., 2008. Mood and neuroendocrine response to a chemical stressor, metyrapone, in buprenorphine-maintained heroin dependence. Biol Psychiatry. 63, 172-7.

Kalueff, A.V., Tuohimaa, P., 2005. The grooming analysis algorithm discriminates between different levels of anxiety in rats: potential utility for neurobehavioural stress research. J Neurosci Methods. 143, 169-77.

Katz, R.J., Roth, K.A., Carroll, B.J., 1981. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression. Neurosci Biobehav Rev. 5, 247-51.

Kauer, J.A., Malenka, R.C., 2007. Synaptic plasticity and addiction. Nat Rev Neurosci. 8, 844-58.

Kennedy, N., Foy, K., Sherazi, R., McDonough, M., McKeon, P., 2007. Long-term social functioning after depression treated by psychiatrists: a review. Bipolar Disord. 9, 25-37.

Kennedy, S.E., Koeppe, R.A., Young, E.A., Zubieta, J.K., 2006. Dysregulation of endogenous opioid emotion regulation circuitry in major depression in women. Arch Gen Psychiatry. 63, 1199-208.

Kenny, P.J., Chen, S.A., Kitamura, O., Markou, A., Koob, G.F., 2006. Conditioned withdrawal drives heroin consumption and decreases reward sensitivity. J Neurosci. 26, 5894-900.

Kessler, R.C., McGonagle, K.A., Zhao, S., Nelson, C.B., Hughes, M., Eshleman, S., Wittchen, H.U., Kendler, K.S., 1994. Lifetime and 12-month prevalence of DSM-III-R psychiatric disorders in the United States. Results from the National Comorbidity Survey. Arch Gen Psychiatry. 51, 8-19.

Kessler, R.C., Berglund, P., Demler, O., Jin, R., Koretz, D., Merikangas, K.R., Rush, A.J., Walters, E.E., Wang, P.S., 2003. The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). JAMA. 289, 3095-105.

Kessler, R.C., Ustun, T.B., 2004. The World Mental Health (WMH) Survey Initiative Version of the World Health Organization (WHO) Composite International Diagnostic Interview (CIDI). Int J Methods Psychiatr Res. 13, 93-121.

Kessler, R.C., Berglund, P., Demler, O., Jin, R., Merikangas, K.R., Walters, E.E., 2005. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. Arch Gen Psychiatry. 62, 593-602.

Kest, B., Palmese, C.A., Hopkins, E., Adler, M., Juni, A., 2001. Assessment of acute and chronic morphine dependence in male and female mice. Pharmacol Biochem Behav. 70, 149-56.

Kest, B., Palmese, C.A., Hopkins, E., Adler, M., Juni, A., Mogil, J.S., 2002. Naloxone-precipitated withdrawal jumping in 11 inbred mouse strains: evidence for common genetic mechanisms in acute and chronic morphine physical dependence. Neuroscience. 115, 463-9.

Khachaturian, H., Watson, S.J., Lewis, M.E., Coy, D., Goldstein, A., Akil, H., 1982. Dynorphin immunocytochemistry in the rat central nervous system. Peptides. 3, 941-54.

Khachaturian, H., Lewis, M.E., Watson, S.J., 1983. Enkephalin systems in diencephalon and brainstem of the rat. J Comp Neurol. 220, 310-20.

Kieffer, B.L., Befort, K., Gaveriaux-Ruff, C., Hirth, C.G., 1992. The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. Proc Natl Acad Sci U S A. 89, 12048-52.

Kieffer, B.L., 1995. Recent advances in molecular recognition and signal transduction of active peptides: receptors for opioid peptides. Cell Mol Neurobiol. 15, 615-35.

Kindermann, S.S., Brown, G.G., 1997. Depression and memory in the elderly: a meta-analysis. J Clin Exp Neuropsychol. 19, 625-42.

Kitchen, I., Slowe, S.J., Matthes, H.W., Kieffer, B., 1997. Quantitative autoradiographic mapping of mu-, delta- and kappa-opioid receptors in knockout mice lacking the mu-opioid receptor gene. Brain Res. 778, 73-88.

Klanecky, A.K., McChargue, D.E., 2009. Emotional reactivity across individuals with varying trauma and substance dependence histories. Ment Health Subst Use. 2, 191-202.

Klein, G., Juni, A., Waxman, A.R., Arout, C.A., Inturrisi, C.E., Kest, B., 2008. A survey of acute and chronic heroin dependence in ten inbred mouse strains: evidence of genetic correlation with morphine dependence. Pharmacol Biochem Behav. 90, 447-52.

Kokkinidis, L., Anisman, H., 1976. Interaction between cholinergic and catecholaminergic agents in a spontaneous alternation task. Psychopharmacology (Berl). 48, 261-70.

Kompagne, H., Bardos, G., Szenasi, G., Gacsalyi, I., Harsing, L.G., Levay, G., 2008. Chronic mild stress generates clear depressive but ambiguous anxiety-like behaviour in rats. Behav Brain Res. 193, 311-4.

Koob, G., Kreek, M.J., 2007. Stress, dysregulation of drug reward pathways, and the transition to drug dependence. Am J Psychiatry. 164, 1149-59.

Koob, G.F., Le Moal, M., 2001. Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. Neuropsychopharmacology. 24, 97-129.

Koob, G.F., 2008. A role for brain stress systems in addiction. Neuron. 59, 11-34.

Koob, G.F., Le Moal, M., 2008. Review. Neurobiological mechanisms for opponent motivational processes in addiction. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 363, 3113-23.

Koob, G.F., 2010. The role of CRF and CRF-related peptides in the dark side of addiction. Brain Res. 1314, 3-14.

Koob, G.F., Volkow, N.D., 2010. Neurocircuitry of addiction. Neuropsychopharmacology. 35, 217-38.

Kosten, T.R., Rounsaville, B.J., Kleber, H.D., 1986. A 2.5-year follow-up of depression, life crises, and treatment effects on abstinence among opioid addicts. Arch Gen Psychiatry. 43, 733-8.

Kreek, M.J., 2001. Drug addictions. Molecular and cellular endpoints. Ann N Y Acad Sci. 937, 27-49.

Kriaucionis, S., Heintz, N., 2009. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. Science. 324, 929-30.

Krishnan, V., Han, M.H., Graham, D.L., Berton, O., Renthal, W., Russo, S.J., Laplant, Q., Graham, A., Lutter, M., Lagace, D.C., Ghose, S., Reister, R., Tannous, P., Green, T.A., Neve, R.L., Chakravarty, S., Kumar, A., Eisch, A.J., Self, D.W., Lee, F.S., Tamminga, C.A., Cooper, D.C., Gershenfeld, H.K., Nestler, E.J., 2007. Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. Cell. 131, 391-404.

Krishnan, V., Nestler, E.J., 2008. The molecular neurobiology of depression. Nature. 455, 894-902.

Kuczenski, R., Segal, D.S., Cho, A.K., Melega, W., 1995. Hippocampus norepinephrine, caudate dopamine and serotonin, and behavioral responses to the stereoisomers of amphetamine and methamphetamine. J Neurosci. 15, 1308-17.

L

Land, B.B., Bruchas, M.R., Lemos, J.C., Xu, M., Melief, E.J., Chavkin, C., 2008. The dysphoric component of stress is encoded by activation of the dynorphin kappa-opioid system. J Neurosci. 28, 407-14.

Lanfumey, L., Mongeau, R., Cohen-Salmon, C., Hamon, M., 2008. Corticosteroid-serotonin interactions in the neurobiological mechanisms of stress-related disorders. Neurosci Biobehav Rev. 32, 1174-84.

Lapiz-Bluhm, M.D., Bondi, C.O., Doyen, J., Rodriguez, G.A., Bedard-Arana, T., Morilak, D.A., 2008. Behavioural assays to model cognitive and affective dimensions of depression and anxiety in rats. J Neuroendocrinol. 20, 1115-37.

Laux, A., Muller, A.H., Miehe, M., Dirrig-Grosch, S., Deloulme, J.C., Delalande, F., Stuber, D., Sage, D., Van Dorsselaer, A., Poisbeau, P., Aunis, D., Goumon, Y., 2011. Mapping of endogenous morphine-like compounds in the adult mouse brain: Evidence of their localization in astrocytes and GABAergic cells. J Comp Neurol. 519, 2390-416.

Law, P.Y., Wong, Y.H., Loh, H.H., 1999. Mutational analysis of the structure and function of opioid receptors. Biopolymers. 51, 440-55.

Le Merrer, J., Becker, J.A., Befort, K., Kieffer, B.L., 2009. Reward processing by the opioid system in the brain. Physiol Rev. 89, 1379-412.

Le Merrer, J., Plaza-Zabala, A., Boca, C.D., Matifas, A., Maldonado, R., Kieffer, B.L., 2010. Deletion of the delta Opioid Receptor Gene Impairs Place Conditioning But Preserves Morphine Reinforcement. Biol Psychiatry.

Le Merrer, J., Befort, K., Gardon, O., Filliol, D., Darcq, E., Dembele, D., Becker, J.A., Kieffer, B.L., 2011. Protracted abstinence from distinct drugs of abuse shows regulation of a common gene network. Addict Biol.

Lee, E.J., Banerjee, S., Zhou, H., Jammalamadaka, A., Arcila, M., Manjunath, B.S., Kosik, K.S., 2011. Identification of piRNAs in the central nervous system. RNA. 17, 1090-9.

Lepine, J.P., Gasquet, I., Kovess, V., Arbabzadeh-Bouchez, S., Negre-Pages, L., Nachbaur, G., Gaudin, A.F., 2005. [Prevalence and comorbidity of psychiatric disorders in the French general population]. Encephale. 31, 182-94.

Leppanen, J.M., 2006. Emotional information processing in mood disorders: a review of behavioral and neuroimaging findings. Curr Opin Psychiatry. 19, 34-9.

Li, N., Lee, B., Liu, R.J., Banasr, M., Dwyer, J.M., Iwata, M., Li, X.Y., Aghajanian, G., Duman, R.S., 2010. mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. Science. 329, 959-64.

Li, S.X., Li, J., Epstein, D.H., Zhang, X.Y., Kosten, T.R., Lu, L., 2008. Serum cortisol secretion during heroin abstinence is elevated only nocturnally. Am J Drug Alcohol Abuse. 34, 321-8.

Lima, F.B., Centeno, M.L., Costa, M.E., Reddy, A.P., Cameron, J.L., Bethea, C.L., 2009. Stress sensitive female macaques have decreased fifth Ewing variant (Fev) and serotonin-related gene expression that is not reversed by citalopram. Neuroscience. 164, 676-91.

Ling, W., Wesson, D.R., Charuvastra, C., Klett, C.J., 1996. A controlled trial comparing buprenorphine and methadone maintenance in opioid dependence. Arch Gen Psychiatry. 53, 401-7.

Ling, W., Amass, L., Shoptaw, S., Annon, J.J., Hillhouse, M., Babcock, D., Brigham, G., Harrer, J., Reid, M., Muir, J., Buchan, B., Orr, D., Woody, G., Krejci, J., Ziedonis, D., 2005. A multi-center randomized trial of buprenorphine-naloxone versus clonidine for opioid detoxification: findings from the National Institute on Drug Abuse Clinical Trials Network. Addiction. 100, 1090-100.

Lintzeris, N., Bell, J., Bammer, G., Jolley, D.J., Rushworth, L., 2002. A randomized controlled trial of buprenorphine in the management of short-term ambulatory heroin withdrawal. Addiction. 97, 1395-404.

Liu, C., Maejima, T., Wyler, S.C., Casadesus, G., Herlitze, S., Deneris, E.S., 2011. Pet-1 is required across different stages of life to regulate serotonergic function. Nat Neurosci. 13, 1190-8.

Liu, D., Diorio, J., Tannenbaum, B., Caldji, C., Francis, D., Freedman, A., Sharma, S., Pearson, D., Plotsky, P.M., Meaney, M.J., 1997. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. Science. 277, 1659-62.

Liu, J., Schulteis, G., 2004. Brain reward deficits accompany naloxone-precipitated withdrawal from acute opioid dependence. Pharmacol Biochem Behav. 79, 101-8.

Lobo, M.K., Karsten, S.L., Gray, M., Geschwind, D.H., Yang, X.W., 2006. FACS-array profiling of striatal projection neuron subtypes in juvenile and adult mouse brains. Nat Neurosci. 9, 443-52.

Loh, H.H., Tseng, L.F., Wei, E., Li, C.H., 1976. beta-endorphin is a potent analgesic agent. Proc Natl Acad Sci U S A. 73, 2895-8.

Lôo, H., Galinowski, A., Poirier, M.F., Chauchot, F., Hartmann, F., Krebs, M.O., Olié, J.P., 2004. Antidépresseurs. Classifications. Encyclopédie médico-chirurgicale. 37-860-B-71.

Lu, L., Shepard, J.D., Hall, F.S., Shaham, Y., 2003. Effect of environmental stressors on opiate and psychostimulant reinforcement, reinstatement and discrimination in rats: a review. Neurosci Biobehav Rev. 27, 457-91.

Lynskey, M.T., Agrawal, A., 2007. Psychometric properties of DSM assessments of illicit drug abuse and dependence: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions (NESARC). Psychol Med. 37, 1345-55.

M

Ma, M.X., Chen, Y.M., He, J., Zeng, T., Wang, J.H., 2007. Effects of morphine and its withdrawal on Y-maze spatial recognition memory in mice. Neuroscience. 147, 1059-65.

Mague, S.D., Pliakas, A.M., Todtenkopf, M.S., Tomasiewicz, H.C., Zhang, Y., Stevens, W.C., Jr., Jones, R.M., Portoghese, P.S., Carlezon, W.A., Jr., 2003. Antidepressant-like effects of kappa-opioid receptor antagonists in the forced swim test in rats. J Pharmacol Exp Ther. 305, 323-30.

Maldonado, R., 1997. Participation of noradrenergic pathways in the expression of opiate withdrawal: biochemical and pharmacological evidence. Neurosci Biobehav Rev. 21, 91-104.

Mandillo, S., Tucci, V., Holter, S.M., Meziane, H., Banchaabouchi, M.A., Kallnik, M., Lad, H.V., Nolan, P.M., Ouagazzal, A.M., Coghill, E.L., Gale, K., Golini, E., Jacquot, S., Krezel, W., Parker, A., Riet, F., Schneider, I., Marazziti, D., Auwerx, J., Brown, S.D., Chambon, P., Rosenthal, N., Tocchini-Valentini, G., Wurst, W., 2008. Reliability, robustness, and reproducibility in mouse behavioral phenotyping: a cross-laboratory study. Physiol Genomics. 34, 243-55.

Mansour, A., Khachaturian, H., Lewis, M.E., Akil, H., Watson, S.J., 1987. Autoradiographic differentiation of mu, delta, and kappa opioid receptors in the rat forebrain and midbrain. J Neurosci. 7, 2445-64.

Mansour, A., Fox, C.A., Burke, S., Meng, F., Thompson, R.C., Akil, H., Watson, S.J., 1994. Mu, delta, and kappa opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: an in situ hybridization study. J Comp Neurol. 350, 412-38.

Mansour, A., Fox, C.A., Akil, H., Watson, S.J., 1995a. Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. Trends Neurosci. 18, 22-9.

Mansour, A., Fox, C.A., Burke, S., Akil, H., Watson, S.J., 1995b. Immunohistochemical localization of the cloned mu opioid receptor in the rat CNS. J Chem Neuroanat. 8, 283-305.

Margolin, A., Kosten, T.R., Avants, S.K., Wilkins, J., Ling, W., Beckson, M., Arndt, I.O., Cornish, J., Ascher, J.A., Li, S.H., et al., 1995. A multicenter trial of bupropion for cocaine dependence in methadone-maintained patients. Drug Alcohol Depend. 40, 125-31.

Marsch, L.A., Bickel, W.K., Badger, G.J., Stothart, M.E., Quesnel, K.J., Stanger, C., Brooklyn, J., 2005. Comparison of pharmacological treatments for opioid-dependent adolescents: a randomized controlled trial. Arch Gen Psychiatry. 62, 1157-64.

Martin-Soelch, C., Kobel, M., Stoecklin, M., Michael, T., Weber, S., Krebs, B., Opwis, K., 2009. Reduced response to reward in smokers and cannabis users. Neuropsychobiology. 60, 94-103.

Martin, C., Grabot, D., Auriacombe, M., Brisseau, S., Daulouede, J.P., Tignol, J., 1996. [Descriptive studies of the use of the Addiction Severity Index in France]. Encephale. 22, 359-63.

Martin, C.S., Chung, T., Langenbucher, J.W., 2008. How should we revise diagnostic criteria for substance use disorders in the DSM-V? J Abnorm Psychol. 117, 561-75.

Mathers, C.D., Loncar, D., 2006. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. PLoS Med. 3, e442.

Matthes, H.W., Maldonado, R., Simonin, F., Valverde, O., Slowe, S., Kitchen, I., Befort, K., Dierich, A., Le Meur, M., Dolle, P., Tzavara, E., Hanoune, J., Roques, B.P., Kieffer, B.L., 1996. Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. Nature. 383, 819-23.

Mattick, R.P., Ali, R., White, J.M., O'Brien, S., Wolk, S., Danz, C., 2003. Buprenorphine versus methadone maintenance therapy: a randomized double-blind trial with 405 opioid-dependent patients. Addiction. 98, 441-52.

Mattick, R.P., Kimber, J., Breen, C., Davoli, M., 2008. Buprenorphine maintenance versus placebo or methadone maintenance for opioid dependence. Cochrane Database Syst Rev. CD002207.

McGowan, P.O., Sasaki, A., D'Alessio, A.C., Dymov, S., Labonte, B., Szyf, M., Turecki, G., Meaney, M.J., 2009. Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. Nat Neurosci. 12, 342-8.

McLaughlin, J.P., Marton-Popovici, M., Chavkin, C., 2003. Kappa opioid receptor antagonism and prodynorphin gene disruption block stress-induced behavioral responses. J Neurosci. 23, 5674-83.

McLaughlin, J.P., Li, S., Valdez, J., Chavkin, T.A., Chavkin, C., 2006. Social defeat stress-induced behavioral responses are mediated by the endogenous kappa opioid system. Neuropsychopharmacology. 31, 1241-8.

McLellan, A.T., Luborsky, L., Woody, G.E., O'Brien, C.P., 1980. An improved diagnostic evaluation instrument for substance abuse patients. The Addiction Severity Index. J Nerv Ment Dis. 168, 26-33.

Merchenthaler, I., Maderdrut, J.L., Cianchetta, P., Shughrue, P., Bronstein, D., 1997. In situ hybridization histochemical localization of prodynorphin messenger RNA in the central nervous system of the rat. J Comp Neurol. 384, 211-32.

Meringolo, M., Brusadin, V., De Luca, M.T., Montanari, C.L., Antonilli, L., Nencini, P., Badiani, A., 2012. Induction of morphine-6-glucuronide synthesis by heroin self-administration in the rat. Psychopharmacology (Berl). 221, 195-203.

Metzger, D.S., Woody, G.E., McLellan, A.T., O'Brien, C.P., Druley, P., Navaline, H., DePhilippis, D., Stolley, P., Abrutyn, E., 1993. Human immunodeficiency virus seroconversion among intravenous drug users in- and out-of-treatment: an 18-month prospective follow-up. J Acquir Immune Defic Syndr. 6, 1049-56.

Meyer-Lindenberg, A., Tost, H., 2012. Neural mechanisms of social risk for psychiatric disorders. Nat Neurosci.

Michelsen, K.A., Schmitz, C., Steinbusch, H.W., 2007. The dorsal raphe nucleus--from silver stainings to a role in depression. Brain Res Rev. 55, 329-42.

Michelsen, K.A., Prickaerts, J., Steinbusch, H.W., 2008. The dorsal raphe nucleus and serotonin: implications for neuroplasticity linked to major depression and Alzheimer's disease. Prog Brain Res. 172, 233-64.

Miczek, K.A., Nikulina, E.M., Shimamoto, A., Covington, H.E., 3rd, 2011. Escalated or Suppressed Cocaine Reward, Tegmental BDNF, and Accumbal Dopamine Caused by Episodic versus Continuous Social Stress in Rats. J Neurosci. 31, 9848-57.

Milne, R.W., Nation, R.L., Somogyi, A.A., 1996. The disposition of morphine and its 3- and 6-glucuronide metabolites in humans and animals, and the importance of the metabolites to the pharmacological effects of morphine. Drug Metab Rev. 28, 345-472.

Mineur, Y.S., Belzung, C., Crusio, W.E., 2006. Effects of unpredictable chronic mild stress on anxiety and depression-like behavior in mice. Behav Brain Res. 175, 43-50.

Moles, A., Kieffer, B.L., D'Amato, F.R., 2004. Deficit in attachment behavior in mice lacking the mu-opioid receptor gene. Science. 304, 1983-6.

Molina, V.A., Heyser, C.J., Spear, L.P., 1994. Chronic variable stress or chronic morphine facilitates immobility in a forced swim test: reversal by naloxone. Psychopharmacology (Berl). 114, 433-40.

Montoya, I.D., Gorelick, D.A., Preston, K.L., Schroeder, J.R., Umbricht, A., Cheskin, L.J., Lange, W.R., Contoreggi, C., Johnson, R.E., Fudala, P.J., 2004. Randomized trial of buprenorphine for treatment of concurrent opiate and cocaine dependence. Clin Pharmacol Ther. 75, 34-48.

Mueller, D., Perdikaris, D., Stewart, J., 2002. Persistence and drug-induced reinstatement of a morphine-induced conditioned place preference. Behav Brain Res. 136, 389-97.

Mueller, T.I., Keller, M.B., Leon, A.C., Solomon, D.A., Shea, M.T., Coryell, W., Endicott, J., 1996. Recovery after 5 years of unremitting major depressive disorder. Arch Gen Psychiatry. 53, 794-9.

Mueller, T.I., Leon, A.C., Keller, M.B., Solomon, D.A., Endicott, J., Coryell, W., Warshaw, M., Maser, J.D., 1999. Recurrence after recovery from major depressive disorder during 15 years of observational follow-up. Am J Psychiatry. 156, 1000-6.

Murray, C.J., Lopez, A.D., 1996. Evidence-based health policy--lessons from the Global Burden of Disease Study. Science. 274, 740-3.

N

Nakanishi, S., Inoue, A., Kita, T., Nakamura, M., Chang, A.C., Cohen, S.N., Numa, S., 1979. Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-beta-lipotropin precursor. Nature. 278, 423-7.

Napoli, C., Lemieux, C., Jorgensen, R., 1990. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. Plant Cell. 2, 279-289.

Narita, M., Kaneko, C., Miyoshi, K., Nagumo, Y., Kuzumaki, N., Nakajima, M., Nanjo, K., Matsuzawa, K., Yamazaki, M., Suzuki, T., 2006a. Chronic pain induces anxiety with concomitant changes in opioidergic function in the amygdala. Neuropsychopharmacology. 31, 739-50.

Narita, M., Kuzumaki, N., Kaneko, C., Hareyama, N., Miyatake, M., Shindo, K., Miyoshi, K., Nakajima, M., Nagumo, Y., Sato, F., Wachi, H., Seyama, Y., Suzuki, T., 2006b. Chronic pain-induced emotional dysfunction is associated with astrogliosis due to cortical delta-opioid receptor dysfunction. J Neurochem. 97, 1369-78.

Nestler, E.J., Aghajanian, G.K., 1997. Molecular and cellular basis of addiction. Science. 278, 58-63.

Nestler, E.J., 2001. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. Nat Rev Neurosci. 2, 119-28.

Nestler, E.J., Barrot, M., DiLeone, R.J., Eisch, A.J., Gold, S.J., Monteggia, L.M., 2002. Neurobiology of depression. Neuron. 34, 13-25.

Nestler, E.J., 2005. Is there a common molecular pathway for addiction? Nat Neurosci. 8, 1445-9.

Nestler, E.J., Carlezon, W.A., Jr., 2006. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. Biol Psychiatry. 59, 1151-9.

Newton, S.S., Thome, J., Wallace, T.L., Shirayama, Y., Schlesinger, L., Sakai, N., Chen, J., Neve, R., Nestler, E.J., Duman, R.S., 2002. Inhibition of cAMP response element-binding protein or dynorphin in the nucleus accumbens produces an antidepressant-like effect. J Neurosci. 22, 10883-90.

Nunes, E.V., Quitkin, F.M., Donovan, S.J., Deliyannides, D., Ocepek-Welikson, K., Koenig, T., Brady, R., McGrath, P.J., Woody, G., 1998. Imipramine treatment of opiate-dependent patients with depressive disorders. A placebo-controlled trial. Arch Gen Psychiatry. 55, 153-60.

Nunes, E.V., Sullivan, M.A., Levin, F.R., 2004. Treatment of depression in patients with opiate dependence. Biol Psychiatry. 56, 793-802.

Nutt, D.J., 2008. Relationship of neurotransmitters to the symptoms of major depressive disorder. J Clin Psychiatry. 69 Suppl E1, 4-7.

O

Observatoire français des drogues et des toxicomanies, 2009. Prévalence de l'usage problématique de drogues en France, estimations 2006.

Observatoire français des drogues et des toxicomanies, 2010. Drogues, chiffres clés. 3ème Edition, Juin 2010.

Observatoire National des Prescriptions et Consommations des Médicaments, 1998. Etude de la prescription et de la consommation des antidépresseurs en ambulatoire. Agence du médicament.

Okaty, B.W., Sugino, K., Nelson, S.B., 2011. Cell type-specific transcriptomics in the brain. J Neurosci. 31, 6939-43.

Oldham, W.M., Hamm, H.E., 2008. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. Nat Rev Mol Cell Biol. 9, 60-71.

Olsen, L., Klausen, M., Helboe, L., Nielsen, F.C., Werge, T., 2009. MicroRNAs show mutually exclusive expression patterns in the brain of adult male rats. PLoS One. 4, e7225.

Olson, V.G., Heusner, C.L., Bland, R.J., During, M.J., Weinshenker, D., Palmiter, R.D., 2006. Role of noradrenergic signaling by the nucleus tractus solitarius in mediating opiate reward. Science. 311, 1017-20.

Ornstein, T.J., Iddon, J.L., Baldacchino, A.M., Sahakian, B.J., London, M., Everitt, B.J., Robbins, T.W., 2000. Profiles of cognitive dysfunction in chronic amphetamine and heroin abusers. Neuropsychopharmacology. 23, 113-26.

P

Palmiter, R.D., 2008. Dopamine signaling in the dorsal striatum is essential for motivated behaviors: lessons from dopamine-deficient mice. Ann N Y Acad Sci. 1129, 35-46.

Panksepp, J., 2003. Neuroscience. Feeling the pain of social loss. Science. 302, 237-9.

Papageorgiou, C., Liappas, I., Asvestas, P., Vasios, C., Matsopoulos, G.K., Nikolaou, C., Nikita, K.S., Uzunoglu, N., Rabavilas, A., 2001. Abnormal P600 in heroin addicts with prolonged abstinence elicited during a working memory test. Neuroreport. 12, 1773-8.

Papageorgiou, C.C., Liappas, I.A., Ventouras, E.M., Nikolaou, C.C., Kitsonas, E.N., Uzunoglu, N.K., Rabavilas, A.D., 2004. Long-term abstinence syndrome in heroin addicts: indices of P300 alterations associated with a short memory task. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 28, 1109-15.

Papaleo, F., Contarino, A., 2006. Gender- and morphine dose-linked expression of spontaneous somatic opiate withdrawal in mice. Behav Brain Res. 170, 110-8.

Pardini, D., White, H.R., Stouthamer-Loeber, M., 2007. Early adolescent psychopathology as a predictor of alcohol use disorders by young adulthood. Drug Alcohol Depend. 88 Suppl 1, S38-49.

Pariante, C.M., Lightman, S.L., 2008. The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. Trends Neurosci. 31, 464-8.

Parks, C.L., Robinson, P.S., Sibille, E., Shenk, T., Toth, M., 1998. Increased anxiety of mice lacking the serotonin1A receptor. Proc Natl Acad Sci U S A. 95, 10734-9.

Parsey, R.V., Oquendo, M.A., Ogden, R.T., Olvet, D.M., Simpson, N., Huang, Y.Y., Van Heertum, R.L., Arango, V., Mann, J.J., 2006. Altered serotonin 1A binding in major depression: a [carbonyl-C-11]WAY100635 positron emission tomography study. Biol Psychiatry. 59, 106-13.

Paxinos, G., Franklin, K.B.J., 1997. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. 2nd ed. New York, Academic Press.

Pearson, S.D., Katzelnick, D.J., Simon, G.E., Manning, W.G., Helstad, C.P., Henk, H.J., 1999. Depression among high utilizers of medical care. J Gen Intern Med. 14, 461-8.

Peregud, D.I., Vorontsova, O.N., Yakovlev, A.A., Panchenko, L.F., Gulyaeva, N.V., 2008. Changes in anxiety in abstinence correlate with the state of the nigrostriatal system in the rat hippocampus. Neurosci Behav Physiol. 38, 443-8.

Perona, M.T., Waters, S., Hall, F.S., Sora, I., Lesch, K.P., Murphy, D.L., Caron, M., Uhl, G.R., 2008. Animal models of depression in dopamine, serotonin, and norepinephrine transporter knockout mice: prominent effects of dopamine transporter deletions. Behav Pharmacol. 19, 566-74.

Petrakis, I., Carroll, K.M., Nich, C., Gordon, L., Kosten, T., Rounsaville, B., 1998. Fluoxetine treatment of depressive disorders in methadone-maintained opioid addicts. Drug Alcohol Depend. 50, 221-6.

Pfeiffer, A., Brantl, V., Herz, A., Emrich, H.M., 1986. Psychotomimesis mediated by kappa opiate receptors. Science. 233, 774-6.

Pinto, H., Maskrey, V., Swift, L., Rumball, D., Wagle, A., Holland, R., 2010. The SUMMIT Trial: A field comparison of buprenorphine versus methadone maintenance treatment. J Subst Abuse Treat.

Pliakas, A.M., Carlson, R.R., Neve, R.L., Konradi, C., Nestler, E.J., Carlezon, W.A., 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, 7397-403.

Pol, O., Palacio, J.R., Puig, M.M., 2003. The expression of delta- and kappa-opioid receptor is enhanced during intestinal inflammation in mice. J Pharmacol Exp Ther. 306, 455-62.

Pollock, N.K., Martin, C.S., 1999. Diagnostic orphans: adolescents with alcohol symptom who do not qualify for DSM-IV abuse or dependence diagnoses. Am J Psychiatry. 156, 897-901.

Popa, D., Cerdan, J., Reperant, C., Guiard, B.P., Guilloux, J.P., David, D.J., Gardier, A.M., 2010. A longitudinal study of 5-HT outflow during chronic fluoxetine treatment using a new technique of chronic microdialysis in a highly emotional mouse strain. Eur J Pharmacol. 628, 83-90.

Porsolt, R.D., Bertin, A., Jalfre, M., 1977. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. Arch Int Pharmacodyn Ther. 229, 327-36.

Porsolt, R.D., Anton, G., Blavet, N., Jalfre, M., 1978. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. Eur J Pharmacol. 47, 379-91.

Pothion, S., Bizot, J.C., Trovero, F., Belzung, C., 2004. Strain differences in sucrose preference and in the consequences of unpredictable chronic mild stress. Behav Brain Res. 155, 135-46.

Pradhan, A.A., Becker, J.A., Scherrer, G., Tryoen-Toth, P., Filliol, D., Matifas, A., Massotte, D., Gaveriaux-Ruff, C., Kieffer, B.L., 2009. In vivo delta opioid receptor internalization controls behavioral effects of agonists. PLoS One. 4, e5425.

Price, J.L., Drevets, W.C., 2010. Neurocircuitry of mood disorders. Neuropsychopharmacology. 35, 192-216.

Przewlocki, R., 2004. Opioid abuse and brain gene expression. Eur J Pharmacol. 500, 331-49.

Pucadyil, T.J., Kalipatnapu, S., Chattopadhyay, A., 2005. The serotonin1A receptor: a representative member of the serotonin receptor family. Cell Mol Neurobiol. 25, 553-80.

Q

Quillinan, N., Lau, E.K., Virk, M., von Zastrow, M., Williams, J.T., 2011. Recovery from mu-opioid receptor desensitization after chronic treatment with morphine and methadone. J Neurosci. 31, 4434-43.

R

Rafieian-Kopaei, M., Gray, A.M., Spencer, P.S., Sewell, R.D., 1995. Contrasting actions of acute or chronic paroxetine and fluvoxamine on morphine withdrawal-induced place conditioning. Eur J Pharmacol. 275, 185-9.

Ragozzino, M.E., Gold, P.E., 1994. Task-dependent effects of intra-amygdala morphine injections: attenuation by intra-amygdala glucose injections. J Neurosci. 14, 7478-85.

Ragozzino, M.E., Gold, P.E., 1995. Glucose injections into the medial septum reverse the effects of intraseptal morphine infusions on hippocampal acetylcholine output and memory. Neuroscience. 68, 981-8.

Randall-Thompson, J.F., Pescatore, K.A., Unterwald, E.M., 2010. A role for delta opioid receptors in the central nucleus of the amygdala in anxiety-like behaviors. Psychopharmacology (Berl). 212, 585-95.

Rao, U., Daley, S.E., Hammen, C., 2000. Relationship between depression and substance use disorders in adolescent women during the transition to adulthood. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry. 39, 215-22.

Rao, U., Hammen, C.L., Poland, R.E., 2009. Mechanisms underlying the comorbidity between depressive and addictive disorders in adolescents: interactions between stress and HPA activity. Am J Psychiatry. 166, 361-9.

Rapeli, P., Kivisaari, R., Autti, T., Kahkonen, S., Puuskari, V., Jokela, O., Kalska, H., 2006. Cognitive function during early abstinence from opioid dependence: a comparison to age, gender, and verbal intelligence matched controls. BMC Psychiatry. 6, 9.

Rattan, A.K., Koo, K.L., Tejwani, G.A., Bhargava, H.N., 1992. The effect of morphine tolerance dependence and abstinence on immunoreactive dynorphin (1-13) levels in discrete brain regions, spinal cord, pituitary gland and peripheral tissues of the rat. Brain Res. 584, 207-12.

Regier, D.A., Farmer, M.E., Rae, D.S., Locke, B.Z., Keith, S.J., Judd, L.L., Goodwin, F.K., 1990. Comorbidity of mental disorders with alcohol and other drug abuse. Results from the Epidemiologic Catchment Area (ECA) Study. JAMA. 264, 2511-8.

Reichel, C.M., Schwendt, M., McGinty, J.F., Olive, M.F., See, R.E., 2011. Loss of Object Recognition Memory Produced by Extended Access to Methamphetamine Self-Administration is Reversed by Positive Allosteric Modulation of Metabotropic Glutamate Receptor 5. Neuropsychopharmacology. 36, 782-92.

Renard, C.E., Dailly, E., David, D.J., Hascoet, M., Bourin, M., 2003. Monoamine metabolism changes following the mouse forced swimming test but not the tail suspension test. Fundam Clin Pharmacol. 17, 449-55.

Renouf, A.G., Kovacs, M., Mukerji, P., 1997. Relationship of depressive, conduct, and comorbid disorders and social functioning in childhood. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry. 36, 998-1004.

Resendez, S.L., Kuhnmuench, M., Krzywosinski, T., Aragona, B.J., 2012. kappa-Opioid Receptors within the Nucleus Accumbens Shell Mediate Pair Bond Maintenance. J Neurosci. 32, 6771-84.

Reynaud, M., 2005. Addictions et psychiatrie. Congrès de Psychiatrie et de neurologie de langue francaise - Masson.

Richardson-Jones, J.W., Craige, C.P., Guiard, B.P., Stephen, A., Metzger, K.L., Kung, H.F., Gardier, A.M., Dranovsky, A., David, D.J., Beck, S.G., Hen, R., Leonardo, E.D., 2010. 5-HT1A autoreceptor levels determine vulnerability to stress and response to antidepressants. Neuron. 65, 40-52.

Rihmer, Z., 2007. Suicide risk in mood disorders. Curr Opin Psychiatry. 20, 17-22.

Robinson, T.E., Berridge, K.C., 1993. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. Brain Res Brain Res Rev. 18, 247-91.

Robinson, T.E., Berridge, K.C., 2001. Incentive-sensitization and addiction. Addiction. 96, 103-14.

Robison, A.J., Nestler, E.J., 2011. Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. Nat Rev Neurosci. 12, 623-37.

Rossier, J., 1993. Biosynthesis of enkephalins and proenkephalin-derived peptides. In: Opioids I, Handbook of Experimental Pharmacology. Vol. 104/I, A. Herz, ed.^eds. Springer-Verlag, Berlin, pp. 423-441.

Rothman, R.B., Gorelick, D.A., Heishman, S.J., Eichmiller, P.R., Hill, B.H., Norbeck, J., Liberto, J.G., 2000. An open-label study of a functional opioid kappa antagonist in the treatment of opioid dependence. J Subst Abuse Treat. 18, 277-81.

Rounsaville, B.J., Kleber, H.D., 1985. Untreated opiate addicts. How do they differ from those seeking treatment? Arch Gen Psychiatry. 42, 1072-7.

Rounsaville, B.J., Kosten, T.R., Weissman, M.M., Kleber, H.D., 1986. Prognostic significance of psychopathology in treated opiate addicts. A 2.5-year follow-up study. Arch Gen Psychiatry. 43, 739-45.

Ruhe, H.G., Mason, N.S., Schene, A.H., 2007. Mood is indirectly related to serotonin, norepinephrine and dopamine levels in humans: a meta-analysis of monoamine depletion studies. Mol Psychiatry. 12, 331-59.

Russo, S.J., Dietz, D.M., Dumitriu, D., Morrison, J.H., Malenka, R.C., Nestler, E.J., 2010. The addicted synapse: mechanisms of synaptic and structural plasticity in nucleus accumbens. Trends Neurosci. 33, 267-76.

S

Sahay, A., Hen, R., 2007. Adult hippocampal neurogenesis in depression. Nat Neurosci. 10, 1110-5.

Sakoori, K., Murphy, N.P., 2005. Maintenance of conditioned place preferences and aversion in C57BL6 mice: effects of repeated and drug state testing. Behav Brain Res. 160, 34-43.

Salamone, J.D., Correa, M., 2002. Motivational views of reinforcement: implications for understanding the behavioral functions of nucleus accumbens dopamine. Behav Brain Res. 137, 3-25.

Salemi, S., Aeschlimann, A., Reisch, N., Jungel, A., Gay, R.E., Heppner, F.L., Michel, B.A., Gay, S., Sprott, H., 2005. Detection of kappa and delta opioid receptors in skin--outside the nervous system. Biochem Biophys Res Commun. 338, 1012-7.

Sanchis-Segura, C., Spanagel, R., 2006. Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. Addict Biol. 11, 2-38.

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, 805-9.

Sanz, E., Yang, L., Su, T., Morris, D.R., McKnight, G.S., Amieux, P.S., 2009. Cell-type-specific isolation of ribosome-associated mRNA from complex tissues. Proc Natl Acad Sci U S A. 106, 13939-44.

Sarter, M., Bodewitz, G., Stephens, D.N., 1988. Attenuation of scopolamine-induced impairment of spontaneous alteration behaviour by antagonist but not inverse agonist and agonist beta-carbolines. Psychopharmacology (Berl). 94, 491-5.

Satel, S.L., Kosten, T.R., Schuckit, M.A., Fischman, M.W., 1993. Should protracted withdrawal from drugs be included in DSM-IV? Am J Psychiatry. 150, 695-704.

Savitz, J., Lucki, I., Drevets, W.C., 2009. 5-HT(1A) receptor function in major depressive disorder. Prog Neurobiol. 88, 17-31.

Schloesser, R.J., Lehmann, M., Martinowich, K., Manji, H.K., Herkenham, M., 2010. Environmental enrichment requires adult neurogenesis to facilitate the recovery from psychosocial stress. Mol Psychiatry.

Schmidt, E.F., Warner-Schmidt, J.L., Otopalik, B.G., Pickett, S.B., Greengard, P., Heintz, N., 2012. Identification of the Cortical Neurons that Mediate Antidepressant Responses. Cell. 149, 1152-63.

Schratt, G., 2009. microRNAs at the synapse. Nat Rev Neurosci. 10, 842-9.

Schuckit, M.A., Smith, T.L., Danko, G.P., Bucholz, K.K., Reich, T., Bierut, L., 2001. Five-year clinical course associated with DSM-IV alcohol abuse or dependence in a large group of men and women. Am J Psychiatry. 158, 1084-90.

Schuckit, M.A., Danko, G.P., Smith, T.L., Bierut, L.J., Bucholz, K.K., Edenberg, H.J., Hesselbrock, V., Kramer, J., Nurnberger, J.I., Jr., Trim, R., Allen, R., Kreikebaum, S., Hinga, B., 2008. The prognostic implications of DSM-IV abuse criteria in drinking adolescents. Drug Alcohol Depend. 97, 94-104.

Schulteis, G., Stinus, L., Risbrough, V.B., Koob, G.F., 1998. Clonidine blocks acquisition but not expression of conditioned opiate withdrawal in rats. Neuropsychopharmacology. 19, 406-16.

Schultz, W., Dayan, P., Montague, P.R., 1997. A neural substrate of prediction and reward. Science. 275, 1593-9.

Seizinger, B.R., Hollt, V., Herz, A., 1984. Proenkephalin B (prodynorphin)-derived opioid peptides: evidence for a differential processing in lobes of the pituitary. Endocrinology. 115, 662-71.

Selley, D.E., Cao, C.C., Sexton, T., Schwegel, J.A., Martin, T.J., Childers, S.R., 2001. mu Opioid receptor-mediated G-protein activation by heroin metabolites: evidence for greater efficacy of 6-monoacetylmorphine compared with morphine. Biochem Pharmacol. 62, 447-55.

Shaham, Y., Stewart, J., 1994. Exposure to mild stress enhances the reinforcing efficacy of intravenous heroin self-administration in rats. Psychopharmacology (Berl). 114, 523-7.

Shi, J., Zhao, L.Y., Epstein, D.H., Zhang, X.L., Lu, L., 2007. Long-term methadone maintenance reduces protracted symptoms of heroin abstinence and cue-induced craving in Chinese heroin abusers. Pharmacol Biochem Behav. 87, 141-5.

Shi, J., Zhao, L.Y., Copersino, M.L., Fang, Y.X., Chen, Y., Tian, J., Deng, Y., Shuai, Y., Jin, J., Lu, L., 2008. PET imaging of dopamine transporter and drug craving during methadone maintenance treatment and after prolonged abstinence in heroin users. Eur J Pharmacol. 579, 160-6.

Shippenberg, T.S., Zapata, A., Chefer, V.I., 2007. Dynorphin and the pathophysiology of drug addiction. Pharmacol Ther. 116, 306-21.

Sim-Selley, L.J., Selley, D.E., Vogt, L.J., Childers, S.R., Martin, T.J., 2000. Chronic heroin self-administration desensitizes mu opioid receptor-activated G-proteins in specific regions of rat brain. J Neurosci. 20, 4555-62.

Sim-Selley, L.J., Scoggins, K.L., Cassidy, M.P., Smith, L.A., Dewey, W.L., Smith, F.L., Selley, D.E., 2007. Region-dependent attenuation of mu opioid receptor-mediated G-protein activation in mouse CNS as a function of morphine tolerance. Br J Pharmacol. 151, 1324-33.

Simonin, F., Gaveriaux-Ruff, C., Befort, K., Matthes, H., Lannes, B., Micheletti, G., Mattei, M.G., Charron, G., Bloch, B., Kieffer, B., 1995. kappa-Opioid receptor in humans: cDNA and genomic cloning, chromosomal assignment, functional expression, pharmacology, and expression pattern in the central nervous system. Proc Natl Acad Sci U S A. 92, 7006-10.

Simonin, F., Valverde, O., Smadja, C., Slowe, S., Kitchen, I., Dierich, A., Le Meur, M., Roques, B.P., Maldonado, R., Kieffer, B.L., 1998. Disruption of the kappa-opioid receptor gene in mice enhances sensitivity to chemical visceral pain, impairs pharmacological actions of the selective kappa-agonist U-50,488H and attenuates morphine withdrawal. EMBO J. 17, 886-97.

Singh, V.P., Jain, N.K., Kulkarni, S.K., 2003. Fluoxetine suppresses morphine tolerance and dependence: modulation of NO-cGMP/DA/serotoninergic pathways. Methods Find Exp Clin Pharmacol. 25, 273-80.

Sinha, R., 2007. The role of stress in addiction relapse. Curr Psychiatry Rep. 9, 388-95.

Slowe, S.J., Simonin, F., Kieffer, B., Kitchen, I., 1999. Quantitative autoradiography of mu-,delta- and kappa1 opioid receptors in kappa-opioid receptor knockout mice. Brain Res. 818, 335-45.

Snyder, J.S., Soumier, A., Brewer, M., Pickel, J., Cameron, H.A., 2011. Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. Nature.

Solecki, W., Ziolkowska, B., Krowka, T., Gieryk, A., Filip, M., Przewlocki, R., 2009. Alterations of prodynorphin gene expression in the rat mesocorticolimbic system during heroin self-administration. Brain Res. 1255, 113-21.

Solomon, R.L., Corbit, J.D., 1973. An opponent-process theory of motivation. II. Cigarette addiction. J Abnorm Psychol. 81, 158-71.

Sovago, J., Dupuis, D.S., Gulyas, B., Hall, H., 2001. An overview on functional receptor autoradiography using [35S]GTPgammaS. Brain Res Brain Res Rev. 38, 149-64.

Stefano, G.B., Salzet, M., Hughes, T.K., Bilfinger, T.V., 1998. Delta2 opioid receptor subtype on human vascular endothelium uncouples morphine stimulated nitric oxide release. Int J Cardiol. 64 Suppl 1, S43-51.

Stein, C., Lang, L.J., 2009. Peripheral mechanisms of opioid analgesia. Curr Opin Pharmacol. 9, 3-8.

Stein, M.D., Solomon, D.A., Herman, D.S., Anderson, B.J., Miller, I., 2003. Depression severity and drug injection HIV risk behaviors. Am J Psychiatry. 160, 1659-62.

Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., Simon, P., 1985. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. Psychopharmacology (Berl). 85, 367-70.

Stinus, L., Caille, S., Koob, G.F., 2000. Opiate withdrawal-induced place aversion lasts for up to 16 weeks. Psychopharmacology (Berl). 149, 115-20.

Strekalova, T., Spanagel, R., Bartsch, D., Henn, F.A., Gass, P., 2004. Stress-induced anhedonia in mice is associated with deficits in forced swimming and exploration. Neuropsychopharmacology. 29, 2007-17.

Sudakov, S.K., Rusakova, I.V., Trigub, M.M., Kudrin, V.S., Klodt, P.M., 2007. Self-administration of morphine by rats causes monoamine release in the anterior cingulate cortex. Bull Exp Biol Med. 144, 210-3.

Sukhotina, I.A., 2001. Morphine withdrawal-facilitated aggression is attenuated by morphine-conditioned stimuli. Pharmacol Biochem Behav. 68, 93-8.

Sun, H., Kennedy, P.J., Nestler, E.J., 2012. Epigenetics of the Depressed Brain: Role of Histone Acetylation and Methylation. Neuropsychopharmacology.

Surratt, C.K., Adams, W.R., 2005. G protein-coupled receptor structural motifs: relevance to the opioid receptors. Curr Top Med Chem. 5, 315-24.

Swendsen, J., Conway, K.P., Degenhardt, L., Glantz, M., Jin, R., Merikangas, K.R., Sampson, N., Kessler, R.C., 2010. Mental disorders as risk factors for substance use, abuse and dependence: results from the 10-year follow-up of the National Comorbidity Survey. Addiction. 105, 1117-28.

T

Talley, C.P., Arankowsky-Sandoval, G., McCarty, R., Gold, P.E., 1999. Attenuation of morphine-induced behavioral changes in rodents by D- and L-glucose. Neurobiol Learn Mem. 71, 62-79.

Tao, R., Auerbach, S.B., 1995. Involvement of the dorsal raphe but not median raphe nucleus in morphine-induced increases in serotonin release in the rat forebrain. Neuroscience. 68, 553-61.

Tao, R., Ma, Z., Auerbach, S.B., 1998. Alteration in regulation of serotonin release in rat dorsal raphe nucleus after prolonged exposure to morphine. J Pharmacol Exp Ther. 286, 481-8.

Tao, R., Auerbach, S.B., 2002a. Opioid receptor subtypes differentially modulate serotonin efflux in the rat central nervous system. J Pharmacol Exp Ther. 303, 549-56.

Tao, R., Auerbach, S.B., 2002b. GABAergic and glutamatergic afferents in the dorsal raphe nucleus mediate morphine-induced increases in serotonin efflux in the rat central nervous system. J Pharmacol Exp Ther. 303, 704-10.

Tao, R., Auerbach, S.B., 2005. mu-Opioids disinhibit and kappa-opioids inhibit serotonin efflux in the dorsal raphe nucleus. Brain Res. 1049, 70-9.

Tassin, J.P., 2008. Uncoupling between noradrenergic and serotonergic neurons as a molecular basis of stable changes in behavior induced by repeated drugs of abuse. Biochem Pharmacol. 75, 85-97.

Tayebi Meybodi, K., Vakili Zarch, A., Zarrindast, M.R., Djahanguiri, B., 2005. Effects of ultra-low doses of morphine, naloxone and ethanol on morphine state-dependent memory of passive avoidance in mice. Behav Pharmacol. 16, 139-45.

Teesson, M., Havard, A., Fairbairn, S., Ross, J., Lynskey, M., Darke, S., 2005. Depression among entrants to treatment for heroin dependence in the Australian Treatment Outcome Study (ATOS): prevalence, correlates and treatment seeking. Drug Alcohol Depend. 78, 309-15.

Tenore, P.L., 2008. Psychotherapeutic benefits of opioid agonist therapy. J Addict Dis. 27, 49-65.

Tiihonen, J., Krupitsky, E., Verbitskaya, E., Blokhina, E., Mamontova, O., Fohr, J., Tuomola, P., Kuoppasalmi, K., Kiviniemi, V., Zwartau, E., 2012. Naltrexone Implant for the Treatment of Polydrug Dependence: A Randomized Controlled Trial. Am J Psychiatry.

Titievsky, J., Seco, G., Barranco, M., Kyle, E.M., 1982. Doxepin as adjunctive therapy for depressed methadone maintenance patients: a double-blind study. J Clin Psychiatry. 43, 454-6.

Todtenkopf, M.S., Marcus, J.F., Portoghese, P.S., Carlezon, W.A., Jr., 2004. Effects of kappa-opioid receptor ligands on intracranial self-stimulation in rats. Psychopharmacology (Berl). 172, 463-70.

Trescot, A.M., Datta, S., Lee, M., Hansen, H., 2008. Opioid pharmacology. Pain Physician. 11, S133-53.

Trezza, V., Baarendse, P.J., Vanderschuren, L.J., 2010. The pleasures of play: pharmacological insights into social reward mechanisms. Trends Pharmacol Sci. 31, 463-9.

Tse, W.S., Bond, A.J., 2004. The impact of depression on social skills. J Nerv Ment Dis. 192, 260-8.

Turchan, J., Lason, W., Budziszewska, B., Przewlocka, B., 1997. Effects of single and repeated morphine administration on the prodynorphin, proenkephalin and dopamine D2 receptor gene expression in the mouse brain. Neuropeptides. 31, 24-8.

Tzschentke, T.M., 1998. Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. Prog Neurobiol. 56, 613-72.

U

Ukai, M., Itoh, J., Kobayashi, T., Shinkai, N., Kameyama, T., 1997. Effects of the kappa-opioid dynorphin A(1-13) on learning and memory in mice. Behav Brain Res. 83, 169-72.

Ukai, M., Watanabe, Y., Kameyama, T., 2000. Effects of endomorphins-1 and -2, endogenous mu-opioid receptor agonists, on spontaneous alternation performance in mice. Eur J Pharmacol. 395, 211-5.

United nations office on drugs and crime, 2010. World drug report.

V

Van Vreeswijk, M.F., De Wilde, E.J., 2004. Autobiographical memory specificity, psychopathology, depressed mood and the use of the Autobiographical Memory Test: a meta-analysis. Behav Res Ther. 42, 731-43.

Vanelle, J.M., Sauvaget-Oiry, A., Juan, F., 2008. [Indications for electroconvulsive therapy]. Presse Med. 37, 889-93.

Videbech, P., Ravnkilde, B., 2004. Hippocampal volume and depression: a meta-analysis of MRI studies. Am J Psychiatry. 161, 1957-66.

Vocci, F.J., Acri, J., Elkashef, A., 2005. Medication development for addictive disorders: the state of the science. Am J Psychiatry. 162, 1432-40.

Volkow, N.D., Wang, G.J., Telang, F., Fowler, J.S., Logan, J., Childress, A.R., Jayne, M., Ma, Y., Wong, C., 2006. Cocaine cues and dopamine in dorsal striatum: mechanism of craving in cocaine addiction. J Neurosci. 26, 6583-8.

Vollstadt-Klein, S., Wichert, S., Rabinstein, J., Buhler, M., Klein, O., Ende, G., Hermann, D., Mann, K., 2010. Initial, habitual and compulsive alcohol use is characterized by a shift of cue processing from ventral to dorsal striatum. Addiction. 105, 1741-9.

W

Wall, P.M., Blanchard, R.J., Yang, M., Blanchard, D.C., 2003. Infralimbic D2 receptor influences on anxiety-like behavior and active memory/attention in CD-1 mice. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 27, 395-410.

Walsh, S.L., Preston, K.L., Bigelow, G.E., Stitzer, M.L., 1995. Acute administration of buprenorphine in humans: partial agonist and blockade effects. J Pharmacol Exp Ther. 274, 361-72.

Walsh, S.L., Strain, E.C., Abreu, M.E., Bigelow, G.E., 2001. Enadoline, a selective kappa opioid agonist: comparison with butorphanol and hydromorphone in humans. Psychopharmacology (Berl). 157, 151-62.

Walther, D.J., Peter, J.U., Bashammakh, S., Hortnagl, H., Voits, M., Fink, H., Bader, M., 2003. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. Science. 299, 76.

Wang, L.M., Wan, W.H., Lu, L.J., 1994. [A bispecific monoclonal antibody with versatile adaptor mediating different cytotoxicities]. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi. 16, 83-7.

Weaver, I.C., Cervoni, N., Champagne, F.A., D'Alessio, A.C., Sharma, S., Seckl, J.R., Dymov, S., Szyf, M., Meaney, M.J., 2004. Epigenetic programming by maternal behavior. Nat Neurosci. 7, 847-54.

Wee, S., Koob, G.F., 2010. The role of the dynorphin-kappa opioid system in the reinforcing effects of drugs of abuse. Psychopharmacology (Berl). 210, 121-35.

White, D.A., Hwang, M.L., Holtzman, S.G., 2005. Naltrexone-induced conditioned place aversion following a single dose of morphine in the rat. Pharmacol Biochem Behav. 81, 451-8.

Williams, J.M., Barnhofer, T., Crane, C., Herman, D., Raes, F., Watkins, E., Dalgleish, T., 2007. Autobiographical memory specificity and emotional disorder. Psychol Bull. 133, 122-48.

Willner, P., Towell, A., Sampson, D., Sophokleous, S., Muscat, R., 1987. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. Psychopharmacology (Berl). 93, 358-64.

Willner, P., 2005. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. Neuropsychobiology. 52, 90-110.

Wise, R.A., Bozarth, M.A., 1987. A psychomotor stimulant theory of addiction. Psychol Rev. 94, 469-92.

Wise, R.A., Rompre, P.P., 1989. Brain dopamine and reward. Annu Rev Psychol. 40, 191-225.

Wise, R.A., Leone, P., Rivest, R., Leeb, K., 1995. Elevations of nucleus accumbens dopamine and DOPAC levels during intravenous heroin self-administration. Synapse. 21, 140-8.

Wise, R.A., 1998. Drug-activation of brain reward pathways. Drug Alcohol Depend. 51, 13-22.

Wise, R.A., 2004. Dopamine, learning and motivation. Nat Rev Neurosci. 5, 483-94.

Wittchen, H.U., Jacobi, F., 2005. Size and burden of mental disorders in Europe--a critical review and appraisal of 27 studies. Eur Neuropsychopharmacol. 15, 357-76.

Woody, G.E., O'Brien, C.P., Rickels, K., 1975. Depression and anxiety in heroin addicts: a placebo-controlled study of doxepin in combination with methadone. Am J Psychiatry. 132, 447-50.

Wu, C.C., Chen, J.Y., Tao, P.L., Chen, Y.A., Yeh, G.C., 2005. Serotonin reuptake inhibitors attenuate morphine withdrawal syndrome in neonatal rats passively exposed to morphine. Eur J Pharmacol. 512, 37-42.

Y

Yasuda, K., Espinosa, R., 3rd, Takeda, J., Le Beau, M.M., Bell, G.I., 1994. Localization of the kappa opioid receptor gene to human chromosome band 8q11.2. Genomics. 19, 596-7.

Yoo, J.H., Lee, S.Y., Loh, H.H., Ho, I.K., Jang, C.G., 2004. Altered emotional behaviors and the expression of 5-HT1A and M1 muscarinic receptors in micro-opioid receptor knockout mice. Synapse. 54, 72-82.

Young, E., Bronstein, D., Akil, H., 1993. Proopiomelanocortin biosynthesis, processing and secretion: functional implications, Vol. 104/1, Springer-Verlag, Berlin.

Yu, M., Hon, G.C., Szulwach, K.E., Song, C.X., Zhang, L., Kim, A., Li, X., Dai, Q., Shen, Y., Park, B., Min, J.H., Jin, P., Ren, B., He, C., 2012. Base-resolution analysis of 5-hydroxymethylcytosine in the Mammalian genome. Cell. 149, 1368-80.

Z

Zastawny, R.L., George, S.R., Nguyen, T., Cheng, R., Tsatsos, J., Briones-Urbina, R., O'Dowd, B.F., 1994. Cloning, characterization, and distribution of a mu-opioid receptor in rat brain. J Neurochem. 62, 2099-105.

Zhang, D., Zhou, X., Wang, X., Xiang, X., Chen, H., Hao, W., 2007. Morphine withdrawal decreases responding reinforced by sucrose self-administration in progressive ratio. Addict Biol. 12, 152-7.

Zhang, G.F., Ren, Y.P., Sheng, L.X., Chi, Y., Du, W.J., Guo, S., Jiang, Z.N., Xiao, L., Luo, X.N., Tang, Y.L., Smith, A.K., Liu, Z.Q., Zhang, H.X., 2008. Dysfunction of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in opioid dependent subjects: effects of acute and protracted abstinence. Am J Drug Alcohol Abuse. 34, 760-8.

Zhao, Z.Q., Gao, Y.J., Sun, Y.G., Zhao, C.S., Gereau, R.W.t., Chen, Z.F., 2007. Central serotonergic neurons are differentially required for opioid analgesia but not for morphine tolerance or morphine reward. Proc Natl Acad Sci U S A. 104, 14519-24.

Zhou, Y., Proudnikov, D., Yuferov, V., Kreek, M.J., 2010. Drug-induced and genetic alterations in stress-responsive systems: Implications for specific addictive diseases. Brain Res. 1314, 235-52.

Zhu, W., Cadet, P., Baggerman, G., Mantione, K.J., Stefano, G.B., 2005. Human white blood cells synthesize morphine: CYP2D6 modulation. J Immunol. 175, 7357-62.

Ziedonis, D.M., Kosten, T.R., 1991. Depression as a prognostic factor for pharmacological treatment of cocaine dependence. Psychopharmacol Bull. 27, 337-43.

Zubieta, J.K., Ketter, T.A., Bueller, J.A., Xu, Y., Kilbourn, M.R., Young, E.A., Koeppe, R.A., 2003. Regulation of human affective responses by anterior cingulate and limbic mu-opioid neurotransmission. Arch Gen Psychiatry. 60, 1145-53.

Pierre-Eric LUTZ

La comorbidité entre dépendance aux opiacés et dépression: mécanismes sérotoninergiques dans un modèle murin

Résumé en français

L'addiction est une affection chronique émaillée de rechutes et de périodes d'abstinence, fortement associée à une prévalence accrue de la dépression. Nous présentons ici notre modèle d'abstinence aux opiacés chez la souris. Suite à un traitement opiacé chronique et au cours de l'abstinence sont apparus progressivement des comportements apparentés à la dépression. Le traitement opiacé modifiait profondément le fonctionnement du système sérotoninergique, notamment dans le noyau du raphé dorsal. Nous avons révélé par des approches génétiques les rôles distincts des 3 récepteurs opioïdes lors de l'abstinence. Enfin, nous avons étudié dans le noyau du raphé dorsal, à l'échelle de l'ensemble du génome, les adaptations transcriptomiques au cours de l'abstinence opiacé et du traitement antidépresseur. Ce travail devrait améliorer notre compréhension de la comorbidité entre dépendance aux opiacés et dépression et suggérer de nouvelles pistes thérapeutiques.

Mots-clés : récepteur opioïde mu, récepteur opioïde delta, récepteur opioïde kappa, addiction, dépression, émotions, abstinence.

Résumé en anglais

Addiction is a chronic relapsing brain disease, with drug abstinence periods strongly associated with depression. We present here our mouse model of opiate abstinence. Following chronic opiate exposure, depressive-like behaviours progressively emerged during abstinence. Morphine treatment profoundly disrupted serotonergic signalling, notably in the dorsal raphe nucleus. We documented by constitutive and conditional knockout strategies the disctinct roles of all 3 opioid receptors during abstinence. Finally, we initiated a large-scale analysis of transcriptomic regulations occurring in dorsal raphe nucleus as a function of heroin abstinence and fluoxetine treatment. These studies should uncover new molecular mechanisms underlying depressive-like behaviors in mice during opiate abstinence and thus put forward new therapeutic targets in humans.

Keywords: mu opioid receptor, delta opioid receptor, kappa opioid receptor, addiction, depression, emotions, abstinence.