

Thèse de Doctorat de l'Université Louis Pasteur Strasbourg I
en Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie
Mention Neurosciences

Présentée par **Celia Goeldner** pour l'obtention du grade de
Docteur de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg

**CONTRIBUTION DU SYSTEME NOCICEPTINE/ORPHANINE FQ
AUX FONCTIONS MNESIQUES ET EMOTIONNELLES
ASSOCIEES A L'HIPPOCAMPE**

Thèse soutenue publiquement le 6 novembre 2008
A l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire

Devant la commission d'examen :

Dr. Abdel-Moultalib OUAGAZZAL
Pr. Brigitte L. KIEFFER
Pr. Jean-Christophe CASSEL
Pr. Jacques MICHEAU
Dr. Florence NOBLE
Dr. Jean-Antoine GIRAULT

Directeur de Thèse, Strasbourg I
Membre invité, Strasbourg I
Président du jury, rapporteur interne, Strasbourg I
Rapporteur externe, Bordeaux I
Rapporteur externe, Paris V
Examineur, Paris VI

REMERCIEMENTS...

Le travail présenté dans ce manuscrit a été réalisé sous la direction du Dr Abdel. M. Ouagazzal dans l'équipe du Pr. Brigitte L. Kieffer. Je tiens tout d'abord à remercier le Dr. Ouagazzal, ou plus simplement Abdel, pour son investissement au cours de ma thèse et ce depuis mes débuts en DEA. Merci de m'avoir initiée à la recherche dans le domaine du comportement et de m'avoir appris à aborder les questions scientifiques de manière rigoureuse et réfléchie. Je souhaite surtout te remercier pour ta disponibilité et de l'intérêt que tu as toujours manifesté envers mes questions, au cours de nos nombreuses discussions. Je tiens également à exprimer ma gratitude à Brigitte, de m'avoir accueillie dans son équipe et de m'avoir permis de mener un projet « parallèle » de manière indépendante au cours de ma dernière année de thèse, en me laissant explorer librement les pistes de mon choix.

Je tiens à vivement remercier le Pr. Jean-Christophe Cassel d'avoir accepté de présider ce jury ainsi que le Pr. Jacques Micheau et le Dr. Florence Noble pour leur investissement en tant que rapporteurs de ce travail. Je souhaite également remercier le Dr. Jean-Antoine Girault d'avoir honoré le jury de sa présence. J'ai beaucoup apprécié les échanges critiques et pertinents avec l'ensemble des membres du jury et souhaite leur témoigner ma gratitude pour cette discussion stimulante.

Merci à l'ensemble des membres du laboratoire, passés et présents, pour les moments passés ensembles depuis « mon déménagement » au troisième étage : merci (par ordre de paillasse!) Claire, Rafael, Katia, Jérôme, Dom, Clara, Chihiro, Julie, Aynah, Carolina, Audrey, Olivier, Lauren, Eric, Xavier H et Xavier R, Sercan, Aline et Michel, ainsi que les « anciens » Cella, Greg et Candice. Je souhaite en particulier remercier Dominique pour son expertise qui m'a été d'une grande utilité lorsque je me suis lancée dans le western blot ainsi que Thomas, mon premier stagiaire, Manu et Pierre-Eric qui reprendra le flambeau, pour leur contribution fructueuse au projet « morphine abstinence ».

Merci également à toute l'équipe du comportement de l'I.C.S, à son responsable Hamid Méziane ainsi qu'à Alexis, Benoit, Christophe, Fabrice, Hanh, Lucie, Marina et Muriel de

m'avoir fait une petite place parmi eux et pour leur aide au quotidien. David, je ne t'ai pas oublié, et je remercie chaleureusement pour tout: on a fait une belle équipe, je resterai toujours ton étudiante...et si j'ai un problème, je viens te voir ;-) !! Merci également à Annie pour ses encouragements et ses conseils.

Evidemment tout ceci n'aurait été possible sans le soutien de ceux qui comptent pour moi et qui ont toujours cru en moi. Mes parents, qui m'ont transmis leurs gènes et leur virus pour ce métier, j'espère être à la hauteur...et mon frère et ma sœur qui sont loin. Finalement, Merci mon Ben, embarqué malgré toi dans cette belle galère, tu m'as supportée et soutenue tout le long, même par temps de tempête...sans vous je n'en serai pas là aujourd'hui.

SOMMAIRE

CONTRIBUTION DU SYSTEME NOCICEPTINE/ORPHANINEFQ AUX FONCTIONS MNESIQUES ET EMOTIONNELLES ASSOCIEES A L'HIPPOCAMPE

INTRODUCTION	2
I LE SYSTEME NOCICEPTINERGIQUE	3
1. DECOUVERTE DU SYSTEME NOCICEPTINERGIQUE	3
2. LE NEUROPEPTIDE NOCICEPTINE/ORPHANINEFQ	3
2.1. SYNTHÈSE A PARTIR DE LA PREPRO-ORPHANINE	3
2.2. DEGRADATION DE LA NOCICEPTINE/ORPHANINEFQ	5
3. LE RECEPTEUR NOP	6
3.1. FAMILLE ET COUPLAGE	6
3.2. LIGANDS DU RECEPTEUR NOP	7
4. DISTRIBUTION ANATOMIQUE DU SYSTEME NOCICEPTINERGIQUE	9
4.1. DETECTION DE LA N/OFQ ET DU RNOP	9
4.2. SYSTEME NERVEUX CENTRAL	10
4.2.1. Moelle épinière	10
4.2.2. Tronc cérébral (mésencéphale, pont, bulbe)	10
4.2.3. Cerveau antérieur (diencéphale, télencéphale)	11
4.3. LOCALISATION PERIPHERIQUE	11
4.4. COMPARAISON DE LA DISTRIBUTION ANATOMIQUE AVEC CELLE DU SYSTEME OPIOÏDE CLASSIQUE	11
5. EFFETS NEUROPHYSIOLOGIQUES	12
6. FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES	13
6.1. NOCICEPTION	14
6.2. LOCOMOTION ET MOTRICITE	15
6.3. COMPORTEMENT ALIMENTAIRE	15
6.4. MOTIVATION ET RECOMPENSE	15
6.5. FONCTIONS EMOTIONNELLES ET COGNITIVES	16

II LES PROCESSUS MNESIQUES

20

1. LA MEMOIRE	20
2. PATHOLOGIE ET TROUBLES MNESIQUES CHEZ L'HOMME	21
3. LES SYSTEMES DE MEMOIRE	22
3.1. MEMOIRE A COURT TERME ET MEMOIRE A LONG TERME	22
3.2. MEMOIRE DECLARATIVE ET NON-DECLARATIVE	22
4. MEMOIRE IMPLICITE	24
4.1. MEMOIRE DES HABITUDES ET HABILITES MOTRICES	24
4.2. MEMOIRE EMOTIONNELLE	24
5. MEMOIRE EXPLICITE	28
6. LA FORMATION HIPPOCAMPIQUE	28
6.1. ORGANISATION ANATOMIQUE ET CYTOARCHITECTONIQUE	28
6.2. CIRCUIT INTERNE DE LA FORMATION HIPPOCAMPIQUE	29
6.3. CONNEXIONS HIPPOCAMPIQUES EXTRINSEQUES	30
6.4. DIFFERENCES DE CONNECTIVITE SELON L'AXE SEPTO-TEMPORAL	31
6.5. NEUROCHIMIE DE L'HIPPOCAMPE	32
6.6. SYSTEME NOCICEPTINERGIQUE HIPPOCAMPIQUE	33
7. LES THEORIES DE LA FONCTION HIPPOCAMPIQUE	34
7.1. LE MODELE DE GRAY ET MAC NAUGHTON	34
7.2. LA THEORIE DE LA MEMOIRE SPATIALE	34
7.3. THEORIES DE LA MEMOIRE CONTEXTUELLE	35
7.4. LA THEORIE DE LA MEMOIRE DECLARATIVE	38
8. BASES MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA MEMOIRE	41
8.1. EN QUETE D'UN « CODE BIOCHIMIQUE » DE LA MEMOIRE	41
8.2. MECANISMES DE PLASTICITE	41
8.3. LES DETERMINANTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA PLASTICITE SYNAPTIQUE	43
8.3.1. LES RECEPTEURS DU GLUTAMATE	43
8.3.2. La CamKII	45
8.3.3. l'AMP cyclique et la PKA	45
8.3.4. Les MAPK	46
8.3.5. Les régulateurs de la transcription	50

III NOCICEPTINE/ORPHANINE FQ ET MEMOIRE

52

1. MEMOIRE DE TRAVAIL	52
2. MEMOIRE SPATIALE	52
3. MEMOIRE EMOTIONNELLE AVERSIVE	53
4. N/OFFQ ET PLASTICITE SYNAPTIQUE	53

IV TRAVAIL DE THESE	55
CONTRIBUTION EXPERIMENTALE ET DISCUSSION	58
1. « LE SYSTEME NOCICEPTINERGIQUE PERTURBE L'ACQUISITION DE LA PEUR CONDITIONNEE CONTEXTUELLE EN INTERAGISSANT AVEC LE SYSTEME GLUTAMATERGIQUE. »	58
1.1. RESUME EN FRANÇAIS	58
1.2. PUBLICATION	60
1.3. DISCUSSION	70
2. « L'ACTIVATION DU RECEPTEUR NOP PERTURBE LA MEMOIRE DE RECONNAISSANCE EN INHIBANT LA SIGNALISATION ERK/MAPK QUI DEPEND DU RECEPTEUR NMDA DANS L'HIPPOCAMPE. »	76
2.1. RESUME EN FRANÇAIS	76
2.2. PUBLICATION	78
2.3. DISCUSSION	94
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	105
 CARACTERISATION COMPORTEMENTALE DE L'ETAT D'ABSTINENCE PROLONGEE A LA MORPHINE CHEZ LA SOURIS	
INTRODUCTION	111
MATERIELS ET METHODES	119
1. ANIMAUX ET CONDITIONS D'HEBERGEMENT	120
2. DROGUES	120
3. SCHEMA EXPERIMENTAL	120
3.1. INDUCTION DE LA DEPENDANCE (CF. SCHEMA EXPERIMENTAL FIGURE 15)	120
3.2. ABSTINENCE (CF. SCHEMA EXPERIMENTAL FIGURE 15 ET 16)	121
3.3. SEVRAGE PRECIPITE	122
4. CARACTERISATION COMPORTEMENTALE DE L'ETAT D'ABSTINENCE	123
4.1. BOITE CLAIRE/OBSCURE	123
4.2. CHAMP OUVERT	123
4.3. INTERACTION SOCIALE	124
4.4. SUSPENSION CAUDALE	124
4.5. NAGE FORCEE	124

5. ANALYSES STATISTIQUES	125
---------------------------------	------------

RESULTATS	126
------------------	------------

1. EXPERIENCE I : INFLUENCE DE LA DUREE D'ABSTINENCE	126
1.1. DEPENDANCE PHYSIQUE (FIGURE 17)	126
1.2. CHAMP OUVERT : ACTIVITE LOCOMOTRICE ET ANXIETE (FIGURE 18)	127
1.3. INTERACTION SOCIALE (FIGURE 19)	129
1.4. SUSPENSION CAUDALE (FIGURE 20)	130
1.5. NAGE FORCEE (FIGURE 21)	131
1.6. SENSIBILITE AU SEVRAGE PRECIPITE AIGU (FIGURE 22)	132
2. EXPERIENCE II : INFLUENCE DE LA FLUOXETINE SUR LE SYNDROME D'ABSTINENCE	134
2.1. CHAMP OUVERT : ACTIVITE LOCOMOTRICE ET ANXIETE (FIGURE 23)	134
2.2. BOITE CLAIRE/OBSCURE (FIGURE 24)	135
2.3. INTERACTION SOCIALE (FIGURE 25)	136
2.4. SUSPENSION CAUDALE (FIGURE 26)	138

DISCUSSION	140
-------------------	------------

1. INDUCTION DE LA DEPENDANCE ET SEVRAGE	140
2. DEVELOPPEMENT D'UN « ETAT D'ABSTINENCE ».	141
3. L'ABSTINENCE, UN TROUBLE EMOTIONNEL DE TYPE DEPRESSIF ?	145

CONCLUSION ET PERSPECTIVES	149
-----------------------------------	------------

REFERENCES	150
-------------------	------------

LISTE DES ABBREVIATIONS

AC :	adénylate cyclase
ADN :	acide désoxyribonucléique
AMPc :	adénosine 3',5'-monophosphate cyclique
ANOVA :	analyse de la variance
ARNm :	acide ribonucléique messenger
BDNF :	<i>brain derived neurotrophic factor</i> , facteur neurotrophique dérivé du cerveau.
BLA :	noyau basolatéral de l'amygdale
CamKII:	calcium/calmoduline kinase II
CA1, 2, 3 :	champs ammoniques 1, 2, 3
Ca ²⁺ :	ion calcium
CeA :	noyau central de l'amygdale
CREB :	cAMP response element binding protein
CRH/F :	hormone/facteur corticotrope
DCI :	déficit de choc immédiat
DG :	gyrus denté
DH :	hippocampe dorsal
DNMTS :	delayed non match to sample
DSM4:	Manuel de diagnostique et de statistiques de l'Association Américaine de Psychiatrie
ERK :	<i>extracellular signal-regulated kinase</i> , kinase régulées par les signaux extracellulaires
GABA :	acide-gamma-amino-butyrique
GIRK :	<i>G inward rectifying potassium channel</i> , canaux potassiques à rectification entrante
i.c.v. :	intra-cérébro-ventriculaire
IEG :	gènes immédiats précoces
IRSS :	inhibiteur de recapture sélectif de la sérotonine
IUPHAR :	International Union of Pharmacology
i.p. :	intra-peritonéal
JNK :	kinase c-jun N-terminale
K ⁺ :	ion potassium

KO NOP : souris génétiquement invalidées pour le récepteur NOP

KO ppN/OFQ : souris génétiquement invalidées pour la préproN/OFQ

LTD : dépression à long terme

LTP : potentialisation à long terme

MAPK : *mitogen activated protein kinase*, protéine kinase activée par les mitogènes

MCT : mémoire à court terme

MEK : MAP/ERK kinase

Mg²⁺ : ion magnésium

MLT : mémoire à long terme

MSK : *mitogen and stress activated kinase*, protéine kinase activée par le stress et les mitogènes.

NA : noradrénaline

Na⁺ : ion sodium

NMDA : N-méthyle-D-aspartate

N/OFQ : nociceptine/orphanine FQ

NOP : nociceptine/orphanine FQ opioïde

ORL-1 : *opioid-receptor-like-1*

PAG : substance grise périaqueducule

PKA : protéine kinase dépendante de l'AMPc.

PKC : protéine kinase dépendante du calcium

ppN/OFQ : prépro-nociceptine/orphanineFQ

RCPG : récepteur couplé aux protéines G

RNMDA : Récepteur du NMDA

RNOP : récepteur du peptide opioïde nociceptine/orphanineFQ

RSK: kinase ribosomique S6

SAPK : *stress activated protein kinase*, protéine kinase activée par le stress

s.c. : sous-cutané

SI : stimulus inconditionnel

SC : stimulus conditionnel

SNA : système nerveux autonome

WT NOP : souris sauvage pour le récepteur NOP

WT ppN/OFQ : souris sauvage pour la prépro-N/OFQ

5-HT : 5-hydroxy-tryptamine ou sérotonine

LISTE DES FIGURES

- Figure 1: Structure de la pré-pronocéptine/orphanine FQ (ppN/OFQ) et séquence peptidique de la nocéptine/orphanine FQ (N/OFQ).
- Figure 2: Représentation schématique de la transduction du signal par le récepteur NOP.
- Figure 3: Sélectivité du Ro64-6198 pour le récepteur NOP et profils d'activation des récepteurs mu, delta et kappa aux opioïdes ainsi que le récepteur nocéptine opioïde.
- Figure 4: Synthèse des fonctions centrales et périphériques régulées par le système nocéptinergique.
- Figure 5: Système limbique et distribution anatomique du système nocéptinergique.
- Figure 6: Taxonomie des systèmes de mémoire.
- Figure 7: Schéma des principaux circuits impliqués dans l'acquisition de la peur conditionnée.
- Figure 8: La formation hippocampique.
- Figure 9: Evaluation de la mémoire contextuelle.
- Figure 10: Paradigmes de reconnaissance d'objet.
- Figure 11: Pharmacologie du récepteur NMDA.
- Figure 12: La voie de signalisation ERK1/2 dans la plasticité synaptique.
- Figure 13: Effet du Ro64-6198 et du MK-801 sur les performances d'alternance spontanée évaluées dans un labyrinthe en Y.
- Figure 14: Influence de la N/OFQ infusée au niveau de l'hippocampe dorsal sur les conduites émotionnelles.
- Figure 15: Schéma expérimental de l'expérience I.
- Figure 16: Schéma expérimental de l'expérience II.
- Figure 17: Evaluation de la dépendance physique.
- Figure 18: Influence de la durée d'abstinence sur l'activité locomotrice et les comportements anxieux évalués dans un champ ouvert.
- Figure 19: Influence de la durée d'abstinence sur les comportements sociaux lors du test d'interaction sociale.
- Figure 20: Influence de la durée d'abstinence sur le comportement de résignation évalué dans le test de la suspension caudale.

- Figure 21: Influence de la durée d'abstinence sur le comportement de résignation évalué dans le test de la nage forcée.
- Figure 22: Influence de la durée d'abstinence sur la sensibilité à la naloxone suite à une injection unique de morphine.
- Figure 23: Influence du traitement chronique avec la fluoxétine sur l'activité locomotrice et les comportements anxieux évalués dans un champ ouvert.
- Figure 24: Influence du traitement chronique avec la fluoxétine sur les comportements anxieux évalués dans le test de la boîte claire/obscur.
- Figure 25: Influence du traitement fluoxétine sur les comportements sociaux lors du test d'interaction sociale.
- Figure 26: Influence du traitement fluoxétine sur le comportement de résignation évalué dans le test de la suspension caudale.

LISTE DES PUBLICATIONS

Goeldner C, Reiss D, Wichmann J, Meziane H, Kieffer BL. & Ouagazzal AM. Nociceptin receptor impairs recognition memory via interaction with NMDA receptor-dependent mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase signaling in the hippocampus. *J Neurosci.* 2008; 28(9):2190-8.

Goeldner C, Reiss D, Wichmann J, Kieffer BL. & Ouagazzal AM. Activation of nociceptin receptor impairs acquisition of contextual fear conditioning in mice through modulation of glutamatergic activity. *In press, Neurobiology of Learning and Memory.*

Goeldner C, Darcq E, Halter T, Lutz PE, Ouagazzal AM & Kieffer BL. „Chronic fluoxetine prevents the development of "depressive-like" behavioral deficits during protracted morphine abstinence in mice”. *In preparation.*

**CONTRIBUTION DU SYSTEME NOCICEPTINE/ORPHANINEFQ
AUX FONCTIONS MNESIQUES ET EMOTIONNELLES
ASSOCIEES A L'HIPPOCAMPE :
APPROCHES PHARMACOLOGIQUE ET COMPORTEMENTALE
CHEZ LA SOURIS**

INTRODUCTION

I LE SYSTEME NOCICEPTINERGIQUE

1. Découverte du système nociceptinergique

Le clonage à grande échelle de récepteurs couplés aux protéines G au cours des années 1990 entraîna l'apparition de nombreux récepteurs, dits orphelins, dont les ligands endogènes demeuraient inconnus. Ceci ouvra la voie à une nouvelle discipline dite de pharmacologie inverse qui permit l'identification de nouveaux ligands peptidiques, dont le premier fut la nociceptine/orphanineFQ. Le récepteur NOP (*nociceptin opioid peptide*) également connu sous le nom de ORL-1 (*opioid receptor-like 1*) a été initialement découvert en tant que quatrième membre de la famille des récepteurs aux opioïdes. Comme les récepteurs mu et kappa aux opioïdes il a été cloné en 1994, par homologie de séquence avec le récepteur delta, (Evans et al., 1992; Kieffer et al., 1992) chez plusieurs espèces. En 1994, Bunzow et collaborateurs et Mollereau et collaborateurs (Bunzow et al., 1994; Mollereau et al., 1994) amplifièrent la séquence putative d'un récepteur à protéines G nouveau, à partir de cerveau de rat (LC132) et humain (hORL1) respectivement. Plusieurs autres groupes clonèrent ensuite la même séquence chez le rat et la souris (Chen et al., 1994; Fukuda et al., 1994; Lachowicz et al., 1995; Wang et al., 1994; Wick et al., 1994). Malgré les 70% d'homologie et 50% d'identité de séquence de ce récepteur avec les récepteurs aux opioïdes (Bunzow et al., 1994) il ne présente pas de liaison de haute affinité pour les peptides opioïdes endogènes, et fut par conséquent considéré comme orphelin jusqu'en 1995. En quête d'un ligand naturel, prédit peptidique et exprimé à l'image de son récepteur majoritairement dans le système nerveux central, deux équipes découvrirent simultanément son ligand endogène. L'équipe de Reinscheid identifia l'orphanine FQ à partir d'extraits d'hypothalamus de porc (Reinscheid et al., 1995) alors que l'équipe de Meunier isolait le même neuropeptide à partir d'extraits de cerveau de rat et le désignait nociceptine, suite à ces effets pro-nociceptifs chez la souris (Meunier et al., 1995).

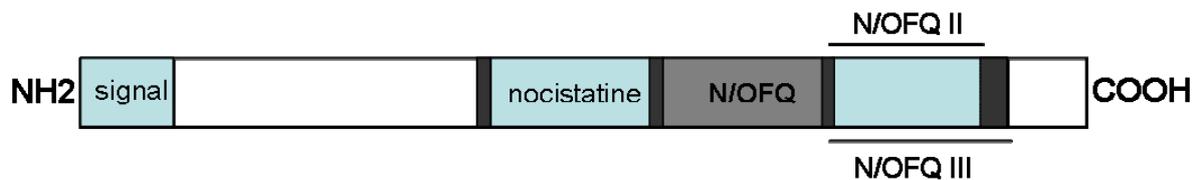
2. Le neuropeptide nociceptine/orphanineFQ

2.1. Synthèse à partir de la prépro-orphanine

La nociceptine ou orphanineFQ (N/OFQ) est un peptide de 17 acides aminés. La dénomination « FQ » fait référence à la présence en positions N- et C-terminales de résidus

phénylalanine (F) et glutamine (Q) respectivement. Le résidu phénylalanine différencie la N/OFQ des peptides opioïdes endogènes, qui possèdent en position N-terminale une tyrosine (Y) caractéristique de leur motif signature « YGGF ». La N/OFQ est issue de la dégradation protéolytique d'un polypeptide précurseur plus long, la prépro-orphanine (ppN/OFQ). Celui-ci dérive d'un gène ancestral commun avec les précurseurs des peptides opioïdes, qui a progressivement évolué vers un système neuromodulateur indépendant (Danielson and Dores, 1999). Le précurseur ppN/OFQ est fortement conservé au cours de l'évolution, et présente 80 à 95% d'homologie entre espèces vertébrées. Son organisation canonique ressemble particulièrement à celle de la prodynorphine (Houtani et al., 1996; Nothacker et al., 1996), cf. figure 1.

La portion N-terminale de la ppN/OFQ code pour un peptide signal dont le clivage produit la pronociceptine, alors que la portion C-terminale comprend la séquence de la N/OFQ flanquée par des motifs basiques de clivage enzymatique (Mollereau et al., 1996). La prohormone convertase 2 est impliquée dans la biosynthèse de la N/OFQ (Allen et al., 2001). Deux autres peptides putatifs sont issus des modifications post-traductionnelles du précurseur : en amont, la nocistatine, un peptide de 17 acides aminés ; en aval, un peptide possédant deux variantes : courte de 17 acides aminés (N/OFQII) ou longue de 20 acides aminés (N/OFQIII), selon la présence ou non de 3 arginines (cf. figure 1). Ces deux peptides ne se lient ni au récepteur NOP, ni aux récepteurs aux opioïdes. La N/OFQII est capable de moduler la locomotion (Florin et al., 1996) et les réponses nociceptives (Rossi et al., 1998). La nocistatine agit comme un antagoniste fonctionnel de la N/OFQ dans plusieurs fonctions physiologiques, telles que la transmission de la douleur, l'anxiété ou encore la mémoire (Okuda-Ashitaka and Ito, 2000) et agirait sur un récepteur couplé aux protéines G (Johnson and Connor, 2007) qui reste à découvrir.

A: pré-pronociceptine/orphanineFQ**B: Alignement de séquence des peptides opioïdes**

N/OFQ	FGGFTGARKSARKLANQ
Dynorphine A	YGGFLRR I RPKLKWDNQ
Met-enkephaline	YGGFM
Leu-enképhaline	YGGFL
β -endorphine	YGGFMTSEKSQTPVTLFKNAI I KNVHKKGQ

Figure 1: Structure de la pré-pronociceptine/orphanineFQ (ppN/OFQ) et séquence peptidique de la nociceptine/orphanineFQ (N/OFQ). (A) La N/OFQ est issue de la dégradation protéolytique d'un peptide précurseur plus long, la ppN/OFQ, au niveau de motifs d'acides aminés basiques (en noir). La nocistatine, en amont, et la N/OFQII et/ou III, en aval, sont également issus de la maturation de la ppN/OFQ. (B) Séquence peptidique de la N/OFQ et alignement avec les peptides opioïdes classiques: la N/OFQ ressemble à la dynorphine A, mais possède un motif N-terminal (FGGF) distinct du motif opioïde (YGGF).

2.2. Dégradation de la nociceptine/orphanineFQ

La dégradation de la N/OFQ par des peptidases produit de nombreux métabolites, et sa durée de demi-vie au niveau du cerveau est assez courte (Gunduz et al., 2006). *In vivo*, le clivage de la N/OFQ suite à son injection dans l'hippocampe de rat interviendrait en deux étapes successives, générant les fragments (1-13) et (14-17) puis (1-9) et (10-13) (Sandin et al., 1999). L'inhibition de l'endopeptidase 24.11 empêche la formation des fragments (1-13) et (14-17) *in vitro* et *in vivo* et serait ainsi impliquée dans la dégradation de N/OFQ (Sakurada et al., 2002; Watanabe et al., 2007). L'endopeptidase 24.15 et l'aminopeptidase N génèrent les fragments N/OFQ(2-17), (1-12), (1-11) et (1-7) (Montiel et al., 1997) qui potentialisent les effets comportementaux centraux induits par la nociceptine, sans être intrinsèquement actifs (Noble and Roques, 1997). Plusieurs métabolites possèdent une activité biologique, indépendante du récepteur NOP. Leurs effets ont surtout été caractérisés dans la modulation

de la douleur : les fragments N-terminaux, principalement N/OFQ(1-7), N/OFQ(1-11) et N/OFQ(1-13) ont des propriétés anti-nociceptives (King et al., 1997; Rossi et al., 1997; Sakurada et al., 2002; Shane et al., 2001) alors que les fragments C-terminaux comme N/OFQ(13-17) et N/OFQ(14-17) sont pro-nociceptifs (Chen et al., 2002; Inoue et al., 2001; Watanabe et al., 2007). Le fragment le plus abondant dans le cerveau, N/OFQ(1-13), a fait l'objet de plusieurs études car sa forme amidée possède une affinité résiduelle pour le récepteur NOP *in vitro*, présentant ainsi un intérêt non négligeable dans le développement de nouveaux ligands. Sa forme native n'est pas affine pour le récepteur NOP et n'a aucun effet sur la mémoire (Sandin et al., 1999) mais possède des propriétés nociceptives qui sont indépendantes du récepteur NOP (Chen et al., 2002).

3. Le récepteur NOP

3.1. Famille et couplage

La séquence du récepteur NOP (RNOP) est également fortement conservée au cours de l'évolution, et présente une homologie de 99% entre formes murine et humaine (Mollereau et al., 1994). Il est classé par L'IUPHAR en tant que membre non-opioïde de la famille des récepteurs aux opioïdes, car son activité est insensible à la naloxone, antagoniste non-sélectif caractérisant cette famille. La structure de ce récepteur couplé aux protéines G (RCPG) de type rhodopsine (classe A) présente une forte homologie de séquence avec les récepteurs aux opioïdes et ses 167 acides aminés sont organisés en structure à sept domaines transmembranaires. La liaison d'agonistes complets (peptidiques ou synthétiques) au niveau N-terminal induit une internalisation rapide et dose-dépendante en cellule CHO surexprimant la forme humaine du récepteur, et une désensibilisation lors de stimulations répétées (Spampinato et al., 2007). Le récepteur NOP est couplé aux protéines G α inhibitrices, principalement de type $\alpha_i(1-3)$ et α_o sensibles à la toxine pertussique, mais peut aussi interagir avec le type α_z dans le cerveau (Connor and Christie, 1999). L'activation des sous-unités $\alpha_{i/o}$ aboutit à l'inhibition de la synthèse d'AMP cyclique par l'adénylate cyclase (AC) (Mollereau et al., 1994) et à la diminution de l'activité des protéines kinases dépendantes de l'AMPc (PKA) (Zhang et al., 1999). Les sous-unités $\beta\gamma$ peuvent activer la voie de signalisation des MAPK (protéines kinases activées par les mitogènes) et inhiber directement les canaux calciques de type T (low voltage activated), L, N et P (high voltage activated) conduisant à la diminution de l'entrée de Ca^{2+} (Chan and Wong, 2000; Lou et al., 1998; New and Wong,

2002; Zhang et al., 1999). D'autre part, elles augmentent l'ouverture de canaux potassique à rectification entrante (canaux GIRK ou canaux potassiques activés par les protéines G (Connor et al., 1996). La conductance potassique qui en résulte favorise la stabilisation du potentiel de membrane à des valeurs proches du potentiel de repos du K^+ et donc à l'hyperpolarisation du neurone (Meunier, 1997; New and Wong, 2002) (cf. figure 2). Un couplage à la phospholipase C par l'intermédiaire de protéines G_z et $G_{\alpha_{14}}$ a également été décrit (Chan et al., 1998; Yung et al., 1999).

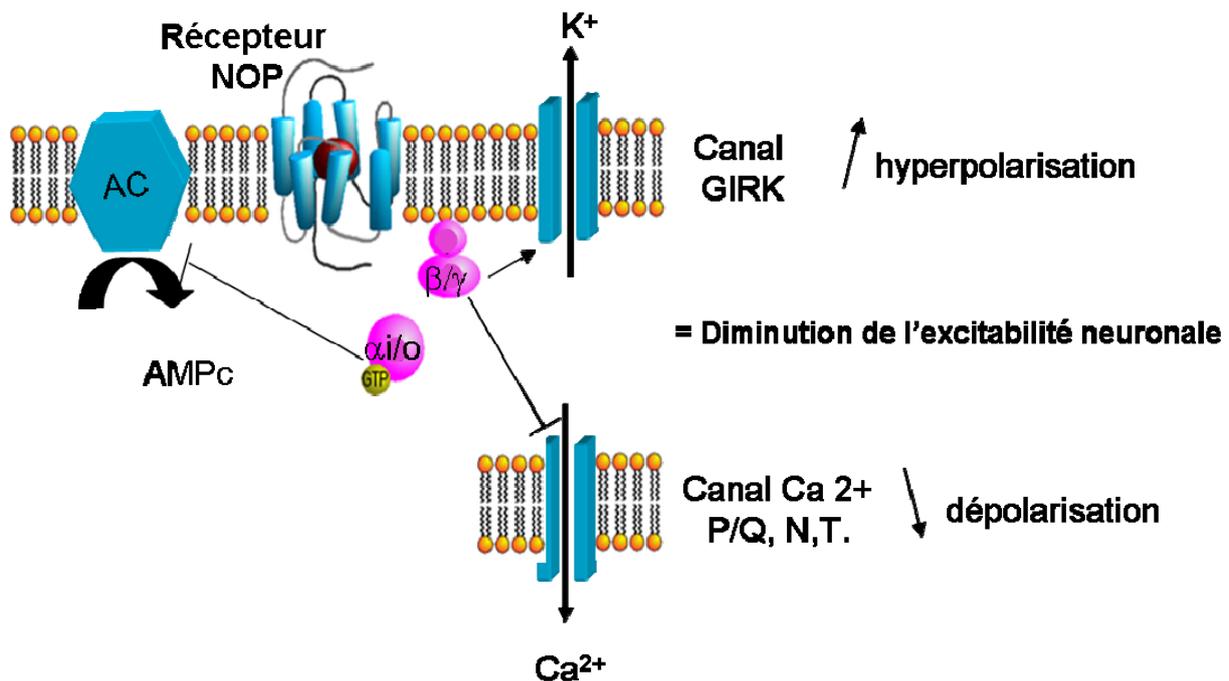


Figure 2: Représentation schématique de la transduction du signal par le récepteur NOP. L'activation du récepteur NOP par un agoniste induit son couplage aux protéines $G_{i/o}$. La sous-unité α inhibe la production d'AMPc par l'adénylate cyclase (AC), alors que les sous-unités γ/β augmente la conductance potassique des canaux GIRK et diminue la conductance calcique par les canaux Ca^{2+} voltage-dépendants. L'activation des RNOP aboutit à une inhibition de l'excitabilité neuronale.

3.2. Ligands du récepteur NOP

Ces dix dernières années, de nombreux ligands du récepteur NOP n'ont cessé d'être développés (Chiou et al., 2007; Zaveri, 2003). Les plus abondants sont les analogues peptidiques de la N/OFQ, particulièrement du fragment N/OFQ(1-13) tronqué et amidé (Guerrini et al., 1997), qui agissent en tant qu'agonistes partiels ou complets comme l'UFP-102 ([Phe⁴,Arg¹⁴,Lys¹⁵]N/OFQ-NH₂, (Carra et al., 2005) ou l'UFP112, [Phe¹Ψ(CH₂-

NH)Gly2]N/OFQ(1-13)-NH₂(Rizzi et al., 2007), dont la puissance et la sélectivité dépasse souvent celle de la nociceptine endogène. Des antagonistes peptidiques ont également été développés, comme l'UFP-101 : (Nphe1,Arg14,Lys15)-N/OFQ-NH₂ (Calo et al., 2002). Il existe également de petites molécules comme le III-BTD ou des hexa-peptides (Becker et al., 1999; Dooley et al., 1997).

Comme pour de nombreux récepteurs récemment desorphelinisés, le développement d'agonistes et d'antagonistes synthétiques est essentiel pour la compréhension de son rôle dans les fonctions normale et pathologique du système nerveux central. Dans l'éventualité d'une application thérapeutique, il est d'autant plus nécessaire d'accéder à des ligands non-peptidiques puissants et sélectifs, qui traversent la barrière hémato-encéphalique, possèdent une meilleure stabilité et qui s'affranchissent des possibles effets des métabolites de dégradation sur d'autres effecteurs (Hallberg and Nyberg, 2003). Les laboratoires Roche ont ainsi développé le premier agoniste synthétique complet du RNOP, le Ro64-6198. Il se lie à haute affinité sur le récepteur NOP (0,4nM) et présente une sélectivité pour ce dernier de 100 à 3000 fois, comparativement aux récepteurs aux opioïdes (Jenck et al., 1997; Jenck et al., 2000; Wichmann et al., 2000) (cf. figure 3). Ce composé est absorbé rapidement, possède une bonne biodisponibilité suite à une injection périphérique et sa dégradation est suffisamment lente. De plus, aucun signe de toxicité ou de tolérance aux effets anxiolytiques du Ro64-6198 ne sont détectés après injections chroniques chez le rat (Dautzenberg et al., 2001). Cet agoniste constitue un outil de choix pour l'étude des fonctions du récepteur NOP *in vivo* (Shoblock, 2007), mais n'est pas commercialement disponible. Actuellement, de nouveaux ligands synthétiques sont en cours de caractérisation, tels que les agonistes SCH221510 ou MCOPPB développés par les laboratoires Schering-Plough (Varty et al., 2008) et Pfizer (Hirao et al., 2008), respectivement, qui ne sont pas plus disponibles. L'antagoniste synthétique de référence SB-612111 (Spagnolo et al., 2007) dont la sélectivité et l'efficacité dépasse celle des antagonistes précédemment caractérisés comme le J-113397, développé par la compagnie Banyu Pharmaceutical (Ozaki 1998) ou le JTC-801 de Japan Tobacco (Shinkai et al., 2000). Malgré son manque de sélectivité, le JTC est tout de même utilisé *in vivo* en raison de sa disponibilité commerciale.

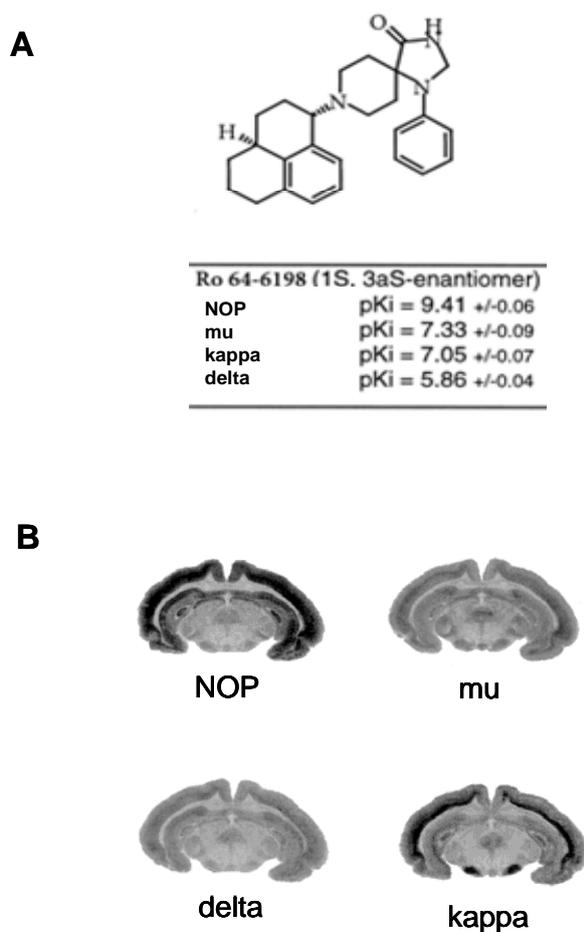


Figure 3: Sélectivité du Ro64-6198 pour le récepteur NOP et profils d'activation du des récepteurs mu, delta et kappa aux opioïdes ainsi que le récepteur nociceptine opioïde.

A: Le Ro 64-6198 est un agoniste synthétique complet et puissant du récepteur NOP, qui possède une selectivité pour NOP 100 à 3000 fois supérieure comparativement aux récepteurs aux opioïdes mu, delta et kappa (Jenck, 2000). B: Profils d'activation fonctionnelle (GTP γ S) du récepteur NOP et des récepteurs aux opioïdes mu, delta et kappa, D'après Sim L., 1997.

4. Distribution anatomique du système nociceptinergique

4.1. Détection de la N/OFQ et du RNOP

La cartographie de l'expression du récepteur NOP et de la N/OFQ au sein du système nerveux central a amplement été étudiée chez le rongeur par détection de l'ARN messenger du récepteur ou de la ppN/OFQ par la technique d'hybridation *in situ* (Boom et al., 1999; Houtani et al., 1996; Nothacker et al., 1996) et au niveau de l'expression protéique par

immunomarquage (Neal et al., 1999a). Dans l'ensemble des données disponibles, une très forte corrélation et/ou co-localisation entre le messager de la ppN/OFQ et la N/OFQ elle-même est mis en avant, suggérant une intervention de ce peptide majoritairement dans des circuits neuronaux locaux. Par manque avéré d'anticorps sélectifs (Corrigendum Evans, (1999; Anton et al., 1996), la localisation anatomique de l'ARN messager du récepteur NOP a été étudiée par hybridation *in situ* (Bunzow et al., 1994; Darland et al., 1998; Fukuda et al., 1994; Mollereau et al., 1996; Neal et al., 1999b; Wick et al., 1994) et sa distribution anatomique et fonctionnelle par radiomarquage (binding et GTP γ S, (Florin et al., 1997; Florin et al., 2000; Gehlert et al., 2006; Neal et al., 1999a; Sim-Selley et al., 2003; Sim and Childers, 1997). L'insertion du gène codant pour le rapporteur lacZ au sein du premier exon du gène du récepteur NOP permet la détection indirecte du récepteur, en rapportant sa *délétion* (Houtani et al., 1996; Nishi et al., 1997) chez les souris déficientes en récepteur NOP (KO NOP). De manière générale, l'expression du RNOP et de son ARNm sont concordantes entre-elles, et coïncide avec celle de la N/OFQ.

4.2. Système nerveux central

4.2.1. Moelle épinière

La N/OFQ et son récepteur sont fortement exprimés dans la substance grise de la corne dorsale et ventrale de la moelle épinière, au niveau des couches superficielles (Houtani et al., 2000; Neal et al., 1999a; Neal et al., 1999b; Pettersson et al., 2002).

4.2.2. Tronc cérébral (mésencéphale, pont, bulbe)

L'expression de N/OFQ et NOP (Neal et al., 1999a; Neal et al., 1999b) est forte dans les noyaux péri- et interpedunculés, le locus coeruleus, les noyaux du raphé, la substance grise périacqueductale (PAG) et le noyau parabrachial. L'expression est forte à modérée dans plusieurs noyaux sensoriels et moteurs (les noyaux de l'olive inférieure et supérieure, trigéminaux, faciaux, du tractus solitaire, vestibulaires), et dans certains noyaux des ganglions de la base comme le pallidum, la substance noire et le noyau sous-thalamique. On relèvera l'absence de ce système dans le cervelet et le striatum chez le rongeur (Houtani et al., 2000). Chez les primates humains et non-humains l'expression de la N/OFQ et du RNOP est qualitativement et quantitativement concordante avec les données obtenues chez le rongeur,

mais ils sont également présents dans le cervelet et le striatum (caudé-putamen) (Berthele et al., 2003; Bridge et al., 2003; Witta et al., 2004).

4.2.3. Cerveau antérieur (diencephale, télencéphale)

L'expression du système nociceptinergique est forte dans plusieurs structures diencephaliques, particulièrement dans les noyaux hypothalamiques (latéral, paraventriculaire, arqué, dorsomedial, ventromedial, supraoptique, supra chiasmatic), dans le septum latéral et médian, le noyau central et médial de l'amygdale, le noyau de la strie terminale, ainsi qu'au niveau du noyau antéro-dorsal du thalamus. Il est absent au niveau des glandes pituitaire et pinéale (Mollereau and Mouledous, 2000). Au sein du télencéphale, l'expression de ce système est très dense dans l'ensemble des structures néocorticales (bulbe olfactif, cortex cingulaire antérieur, insulaire, piriforme, enthorinal et perirhinal) et le récepteur NOP est particulièrement visible au niveau des couches II à VI (Neal et al., 1999a).

4.3. Localisation périphérique

Malgré leur expression majoritaire dans le système nerveux central, le récepteur NOP et la N/OFQ sont présents au sein de l'organisme dans plusieurs tissus périphériques. Les messagers du récepteur et du peptide sont présents au sein du système vasculaire, immunitaire dans les lymphocytes et monocytes humains (Peluso et al., 1998) et murins (Halford et al., 1995), tout au long du système gastro-intestinal (Osinski and Brown, 2000), ainsi qu'au niveau des voies respiratoires (McLeod et al., 2001). Il participe de ce fait à la régulation des fonctions cardiovasculaire, immunitaire, digestive, urogénitale et respiratoire.

4.4. Comparaison de la distribution anatomique avec celle du système opioïde classique

Dans son ensemble, la cartographie du système nociceptinergique est similaire au système opioïde classique au niveau périphérique, mais révèle des différences au niveau du système nerveux central (Sim and Childers, 1997) (cf. figure 3). On relèvera par exemple la faible co-localisation entre la N/OFQ et les peptides opioïdes dans la moelle épinière (Riedl et al., 1996) ou l'absence notoire de détection de ce système dans le striatum chez le rongeur, une région dense en récepteur aux opioïdes. Au niveau de l'hippocampe, les récepteurs mu et delta aux opioïdes sont préférentiellement exprimés sur les interneurons inhibiteurs contrairement aux récepteurs kappa et NOP, localisés essentiellement sur les neurones

granulaires et pyramidaux (Simmons and Chavkin, 1996). D'autre part, des différences d'expression quantitatives existent, au niveau des structures corticales, pour ne citer qu'un exemple, et le profil d'activation de chacun des récepteurs mu, delta, kappa et NOP dans le cerveau est unique (Shimohira et al., 1997; Sim and Childers, 1997). Ces différences confèrent des propriétés distinctes au système nociceptinergique, qui ont progressivement mené à la considération de ce système en tant qu'unité fonctionnellement indépendante des opioïdes.

5. Effets neurophysiologiques

L'activation du récepteur NOP conduit à l'hyperpolarisation neuronale, et entraîne en conséquence une diminution de la fréquence de décharge des neurones, soit plus généralement de l'excitabilité neuronale. Ceci se traduit par une réduction des potentiels d'action et/ou des courants post-synaptiques évoqués (Moran et al., 2000). En effet, la N/OFQ réduit les courants inhibiteurs et excitateurs spontanés au niveau des noyaux suprachiasmatiques (Gompf et al., 2005), de l'hypothalamus et de l'amygdale (Roberto and Siggins, 2006). Elle diminue aussi les courants excitateurs évoqués par l'application d'agonistes glutamatergiques (AMPA et NMDA) dans la moelle épinière, et dans le gyrus denté de l'hippocampe (récepteurs NMDA mais non AMPA (Yu and Xie, 1998). La N/OFQ inhibe également la potentialisation (Yu and Xie, 1998) et la dépression à long terme (Wei and Xie, 1999) dans l'hippocampe. Libérée par des interneurones, elle inhibe la potentialisation à long terme au niveau des cellules pyramidales du champ CA1, suite à une stimulation tétanique (Bongsebandhu-phubhakdi and Manabe, 2007).

Au niveau pré-synaptique l'inhibition se traduit par une diminution de la libération de neurotransmetteurs et de la transmission synaptique. *Ex vivo*, l'application de N/OFQ diminue de manière dose-dépendante la libération de neurotransmetteurs (amines, GABA, glutamate) dans plusieurs structures dont l'hippocampe, l'amygdale et l'hypothalamus, ces effets étant insensibles à la naloxone (Moran et al., 2000). Les effets de la N/OFQ sur la libération de neurotransmetteurs ont été confirmés par des études de microdialyse *in vivo* chez le rat (Meis, 2003; Schlicker and Morari, 2000). Celles-ci indiquent que la N/OFQ inhibe la libération de dopamine (Marti et al., 2005; Murphy et al., 1999) au niveau du noyau accumbens et du striatum, d'acétylcholine au niveau du striatum (Itoh et al., 1999), de noradrénaline au niveau cortical préfrontal (Okawa et al., 2001) et de sérotonine au niveau du noyau accumbens (Tao

et al., 2007). L'invalidation génétique du récepteur NOP chez la souris s'accompagne d'une augmentation du tonus cholinergique basal dans l'hippocampe (Uezu et al., 2005). Ces données suggèrent un rôle neuromodulateur inhibiteur puissant du système nociceptinergique au niveau du système nerveux central.

6. Fonctions physiologiques

En accord avec sa vaste distribution anatomique, le système N/OFQ-NOP participe à de nombreuses fonctions physiologiques (Lambert, 2008; Mogil and Pasternak, 2001), dont les principales seront décrites par la suite. La figure 4 récapitule l'implication du système nociceptinergique dans les différentes fonctions physiologiques.

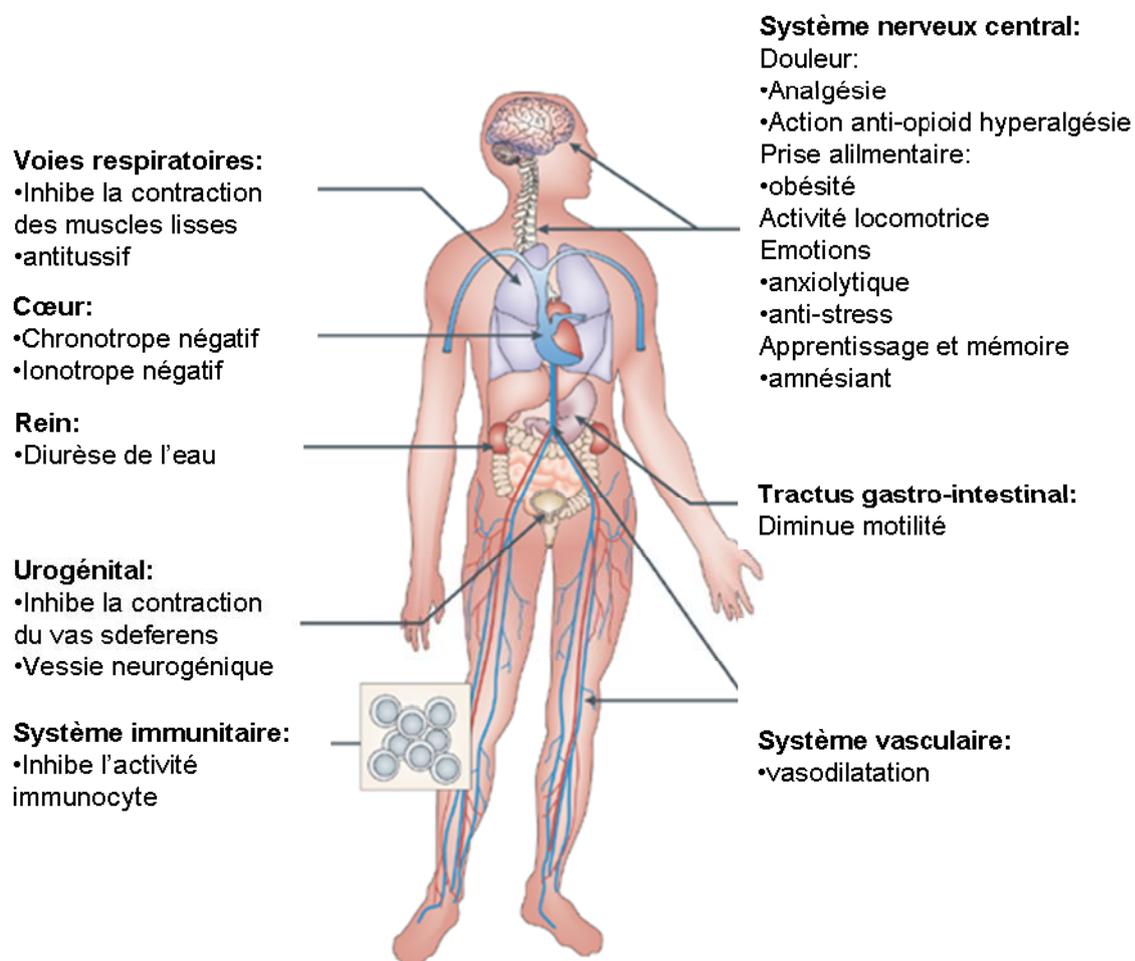


Figure 4: Synthèse des fonctions centrales et périphériques régularisées par le système nociceptinergique. Le système nociceptinergique régularise plusieurs fonctions physiologiques, périphériques et centrales. D'après Lambert, 2008.

6.1. Nociception

Le rôle du système nociceptinergique dans le contrôle de la douleur a été intensivement étudié dès son identification, et sa capacité à induire l'hyperalgésie chez le rat lui a du reste valu la dénomination de nociceptine (Meunier et al., 1995). Plusieurs régions du système nerveux nécessaires à la transmission de l'information nociceptive expriment le système nociceptinergique et son action sur la douleur est complexe et dépend de son site d'action. Selon la compréhension actuelle des effets de la N/OFQ sur la douleur, une régulation biphasique est décrite : antinociceptive spinale et pronociceptive « anti-opioïde » supraspinale (Heinricher, 2005; Mogil and Pasternak, 2001).

Les propriétés antinociceptives spinales de la N/OFQ sur diverses modalités de douleur aiguë (Heinricher, 2003; Heinricher, 2005; Nazzaro et al., 2007; Zeilhofer and Calo, 2003) sont classiques, et correspondraient à un mode d'action « opioïde », en inhibant la transmission de l'influx douloureux. Au niveau supraspinal les mécanismes sont plus complexes, et la N/OFQ peut produire des effets hyperalgésiants, mais des effets hypoalgésiants ont également été décrits. Des considérations expérimentales expliquent en partie ces divergences, comme l'espèce, le sexe, la modalité de douleur testée, et surtout les conditions de stress (Mogil and Pasternak, 2001). L'action hyperalgésique supraspinale décrite lors des premières études est considérée aujourd'hui comme le résultat d'une action anti-analgésique. En effet, la N/OFQ supraspinale est capable de contrecarrer l'analgésie induite par le stress, les opiacés, le GABA et même l'acupuncture (Grisel and Mogil, 2000; Mogil et al., 1999; Rizzi et al., 2001; Tian et al., 1998). L'activation systémique du RNOP chez la souris, par l'agoniste Ro64-6198 est analgésique, mais peut induire des effets anti-analgésiques lorsque les conditions expérimentales sont stressantes (Reiss et al., 2008) alors que son blocage systémique est pronociceptif (Rizzi et al., 2006).

Actuellement, l'étude du système nociceptinergique endogène dans le contrôle de la douleur s'oriente principalement vers un rôle dans l'atténuation des douleurs chroniques d'origine neurogénique ou inflammatoire. Une inhibition des réponses nociceptives est décrite chez l'animal neuropathique suite à l'activation exogène du récepteur NOP (Chiou et al., 2007). Ce dernier pourrait devenir une cible de choix dans le traitement des douleurs chroniques, pour laquelle l'efficacité des opioïdes classiques reste controversée (Breivik, 2005).

6.2. Locomotion et motricité

Le système N/OFQ-NOP est présent aux différents niveaux des circuits contrôlant la motricité, des circuits spinaux dans la corne ventrale de la moelle épinière au cortex moteur en passant par certains noyaux moteurs pontins et bulbaires et les ganglions de la base. La N/OFQ réduit l'activité locomotrice chez le rat et la souris (Higgins et al., 2001; Koizumi et al., 2004; Murphy et al., 1999; Narayanan et al., 2004; Noble and Roques, 1997). La N/OFQ et le Ro-646198 perturbent également la coordination motrice (Higgins et al., 2001; Marti et al., 2008). A de très fortes doses, l'activation des récepteurs NOP par la N/OFQ ou l'agoniste Ro64-6198 induit des effets neurologiques, dont la perte du tonus musculaire, la perte des réflexes de « retournement » et l'ataxie (Devine et al., 1996b; Higgins et al., 2001; Jenck et al., 2000). A l'opposé, la délétion du récepteur NOP ou son blocage pharmacologique ne modifient pas la locomotion spontanée (Koizumi et al., 2004; Nishi et al., 1997). Par contre l'antagonisme des RNOP diminue l'hypokinésie dans des modèles de parkinsonisme, chez la souris et le macaque (Marti et al., 2005; Viaro et al., 2008).

6.3. Comportement alimentaire

Le système nociceptinergique est exprimé au niveau des noyaux hypothalamiques, parabrachiaux et du tractus solitaire qui régulent la consommation et les comportements alimentaires. Il promeut la prise alimentaire et agirait principalement en inhibant les effets anorexigènes d'autres médiateurs tels que le CRF (cortico-releasing factor) ou l'ocytocine. Par contre, il ne semble pas influencer les comportements dipsiques (Ciccocioppo et al., 2004).

6.4. Motivation et récompense

La détection du système nociceptinergique au sein de la voie dopaminergique mésolimbique et des structures limbiques indique un rôle plausible dans la régulation des comportements motivés par la récompense. Ni le peptide endogène, ni l'agoniste Ro-646198, ne possèdent de propriétés appétitives intrinsèques (Devine et al., 1996a; Jenck et al., 2000; Le Pen et al., 2002). Cependant l'activation de ce système diminue l'instauration des comportements de préférence de place à l'alcool et à certaines drogues d'abus dont la morphine (Kuzmin et al., 2003; Shoblock et al., 2005), et la cocaïne (Sakoori and Murphy, 2004). Il réduit également la ré-instauration de la recherche de drogue ou d'alcool induite par le stress (Koob, 2008).

6.5. Fonctions émotionnelles et cognitives

La N/OFQ et son récepteur sont fortement exprimés dans les structures corticales et limbiques (Neal et al., 1999a; Neal et al., 1999b) (cf. figure 5). Cette distribution suggère un rôle fondamental du système nociceptinergique dans la régulation des fonctions émotionnelles et cognitives. Je détaillerai ici les données qui impliquent le système nociceptinergique dans la régulation des conduites émotionnelles. Le rôle de la N/OFQ dans les fonctions cognitive et mnésique sera abordé dans la dernière partie de l'introduction (cf. N/OFQ et mémoire).

A: Distribution anatomique du système nociceptinergique

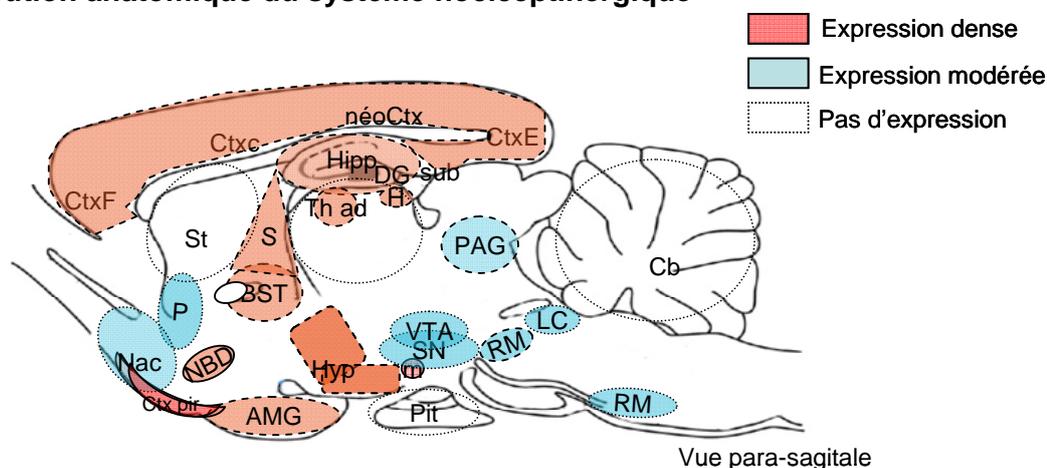
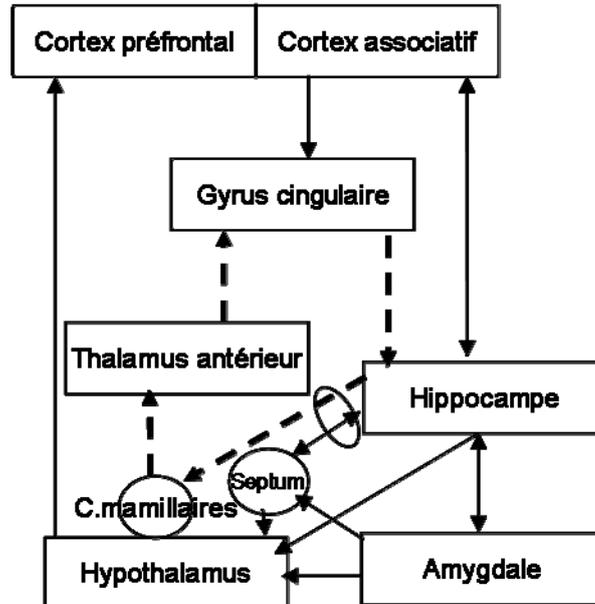


Figure 5:

(A) Expression de l'ARNm du récepteur NOP et du précurseur de la N/OFQ dans le cerveau de rongeur AMG: complexe amygdalien, BST: noyau du lit de la strie terminale, Cb: cervelet, Ctx: cortex (frontal, cingulaire, néocortex, enthorinal, piriforme), DG: gyrus denté, H: habénula, Hipp: hippocampe, Hyp: noyaux hypothalamiques, LC: locus coeruleus, M: corps mamillaires, Nac: noyau accumbens, NTS: noyau du tractus solitaire, P: pallidum, PAG: substance grise périacqueducale, Pit: glande pituitaire, RM Raphe magnus, S: septum, SN: substance noire, St: striatum, sub: subiculum, Thad: Thalamus antéro-dorsal.



(B) Conception actuelle du réseau de structures qui composent le système limbique. La boucle hippocampo-mamillo-thalamo-cingulaire initialement décrite s'étend aujourd'hui à la substance grise périacqueducale, aux corps mamillaires, à l'amygdale et au cortex frontal.

Le neuropeptide N/OFQ possède des propriétés globalement anxiolytiques. En effet, l'administration de N/OFQ supra-spinale (injections i.c.v.) réduit les conduites anxieuses dans le test de la boîte claire/obscur chez la souris, et le test du labyrinthe en croix surélevé chez le rat et la souris, avec un profil « en U inversé » rappelant celui du diazépam, les fortes doses étant sédatives (Gavioli et al., 2002; Jenck et al., 1997). Dans ce même paradigme, la N/OFQ contrecarre les réponses anxieuses générées par la nocistatine (Gavioli et al., 2002; Jenck et al., 1997). La N/OFQ diminue également certaines réponses défensives chez la souris, dont l'attaque défensive en situation de confrontation avec un rat, sans modifier les réponses de fuite ou d'évaluation du risque (Griebel et al., 1999). L'agoniste Ro64-6198 également un profil anxiolytique robuste dans de nombreux paradigmes chez les rongeurs (Dautzenberg et al., 2001; Jenck et al., 2000; Varty et al., 2005; Wichmann et al., 2000). Chez la souris, le Ro64-6198 diminue également les conduites anxieuses dans un paradigme de conflit de Geller-seifter ou d'enfouissement de billes (Jenck et al., 2000; Nicolas et al., 2006; Varty et al., 2005). Notons que chez la souris ces effets sont moins marqués dans les tests d'anxiété éthologique (labyrinthe en croix surélevé, boîte claire/obscur), probablement en raison d'une sensibilité accrue de cette espèce aux effets sédatifs du composé (Higgins et al., 2001). Les effets anxiolytiques du Ro64-6198 sont spécifiques du récepteur NOP: ses

propriétés anxiolytiques sont abolies chez les souris KO NOP ou suite à l'antagonisme du récepteur NOP par le J-113397 chez le rat (Varty et al., 2005). Les propriétés anxiolytiques de plusieurs autres agonistes du RNOP ont récemment été caractérisées chez le rat, le cochon d'inde et chez la souris (Gavioli et al., 2007; Hirao et al., 2008; Varty et al., 2008). Quelques données suggèrent une potentialisation des conduites anxieuses chez les souris KO NOP ou suite à l'administration de N/OFQ dans le labyrinthe en croix surélevé et la boîte claire/obscur chez le rat (Devine et al., 2001).

La délétion du peptide précurseur de la N/OFQ chez la souris (ppN/OFQ KO) induit une sensibilité accrue au stress. Les animaux hébergés en conditions stressantes (groupées) montrent une potentialisation du niveau d'anxiété dans les dispositifs du champ ouvert, de la boîte claire/obscur et du labyrinthe en croix surélevé, ainsi qu'une potentialisation du réflexe de sursaut (Koster et al., 1999; Ouagazzal et al., 2003), indiquant une action inhibitrice du tonus nociceptinergique dans les réponses anxieuses normales. La délétion génétique du récepteur NOP n'influence pas les conduites émotionnelles aussi clairement, et ses effets sont sensibles à la fois au fond génétique et à la modalité anxieuse évaluée. Dans le test du labyrinthe en croix surélevé, par exemple, l'absence de récepteur NOP favorise les comportements anxieux sur fond génétique CD1 alors qu'elle n'a pas d'influence sur ceux-ci sur fond génétique mixte C57bl6/129pas (Gavioli et al., 2007; Mamiya et al., 1998). A l'opposé, les souris NOP KO sur fond génétique CD1 peuvent également montrer une diminution des réponses anxieuses dans certains cas (test de l'hyponéophagie, et du labyrinthe en T, (Gavioli et al., 2007). Le système nociceptinergique endogène semble également réguler les réponses émotionnelles face à un stress incontrôlable induisant des modifications des comportements de motivation et/ou résignation (cf. intro partie II). L'absence du récepteur NOP chez les souris (Gavioli et al., 2003; Gavioli et al., 2004) ou son blocage pharmacologique (J113397 et SB-612111) et peptidiques (UFP-101 et [Nphe1]-nociceptin-(1-13)-NH₂), réduit les réponses d'immobilité évaluées dans le test de nage forcée chez le rat et la souris et ces effets ont été confirmés dans le test de la suspension caudale chez la souris (Redrobe et al., 2002; Rizzi et al., 2007). Dans leur ensemble, ces données indiquent une sensibilité augmentée au stress, en conséquence de l'ablation génétique du système nociceptinergique.

Les substrats neuronaux qui médient la régulation nociceptinergique des conduites émotionnelles commencent seulement à être identifiés, et quelques études s'y sont intéressées chez le rat. L'injection locale de N/OFQ dans la PAG réduit nettement les vocalisations chez le cochon d'inde (Kyuhou and Gemba, 1999). Le noyau du lit de la strie terminale (BNST) semble aussi être un site d'action important, et la N/OFQ administrée dans ce noyau diminue les conduites anxieuses et contrecarre les effets centraux du CRF dans le test du labyrinthe en croix surélevé (Rodi et al., 2008). Au niveau de l'amygdale, la N/OFQ montre une action anxiolytique au sein du CeA et non du BLA dans ce même test (Uchiyama et al., 2008). Le rôle de l'hippocampe dans le contrôle des conduites émotionnelles n'a jamais été abordé.

II LES PROCESSUS MNESIQUES

1. La mémoire

La mémoire est un processus cognitif indispensable qui permet aux hommes comme aux animaux d'acquérir et de conserver différents types d'informations, afin de développer ultérieurement de nouvelles capacités permettant d'adapter au mieux leurs comportements à leur environnement, dans le but d'augmenter leurs chances de survie. Elle se définit comme une capacité à restituer une information ou à reconnaître celle-ci parmi d'autres. C'est d'ailleurs lorsqu'elle fait défaut, suite à des accidents ou dans la pathologie d'Alzheimer par exemple, qu'il est possible de se rendre compte des nombreux comportements qui en dépendent : la perte de la mémoire et de la reconnaissance conduit à la perte de son identité, du savoir-faire, de ses connaissances et de ce fait de son autonomie. Les phénomènes de mémorisation font appel à un ensemble de processus neurophysiologiques séquentiels (ou étapes) (Chapoutier, 2006) : L'*acquisition* ou encodage correspond au processus d'enregistrement d'éléments nouveaux de l'environnement. Ces éléments doivent ensuite subir une étape de *consolidation* afin d'être conservés ou stockés : on parle alors de *rétenion* de l'information. Finalement, les éléments stockés doivent être accessibles à posteriori, soit à la conscience, soit aux fonctions cérébrales exécutives, par une étape de restitution ou de *rappel*. L'information restituée, souvent déclenchée par des indices de rappel, peut alors directement influencer la réponse comportementale en cours et modifier les performances. Lors du rappel, les traces mnésiques peuvent être modifiées et reconsolidées (Dudai, 2006). Le terme *apprentissage* désigne les modifications durables du comportement en réponse à une expérience et fait appel aux étapes d'acquisition, de rétenion et de rappel décrites précédemment. Une atteinte spécifique de chacun de ces processus engendre des déficits mnésiques différents : l'amnésie antérograde désigne la perte des facultés d'acquisition et ainsi de la formation de nouveaux souvenirs alors que l'amnésie rétrograde indique la perte des facultés de rappel et de l'accès aux informations préalablement stockées. Le dernier processus important, souvent perçu à tort en opposition à la mémoire, est le phénomène d'oubli. Celui-ci est essentiel à la sélection des informations stockées, en fonction de leur pertinence et du temps qui passe. Il peut être considéré comme un processus de déclin naturel de la trace mnésique en l'absence de renforcement ou une forme de ré-acquisition qui modifie celle-ci. L'oubli peut également résulter d'un déficit des fonctions de rappel (Cammarota et

al., 2005; Myers and Davis, 2002). Un système de mémoire unique, capable de manipuler les divers types d'informations au cours de ces différentes phases est envisageable, mais peu probable compte tenu de leur complexité. La conception actuelle, acceptée depuis le début des années 1980 seulement (Cohen et al., 1985; Scoville and Milner, 2000), décrit un ensemble de modules spécialisés pour traiter et/ou conserver différents types d'informations.

2. Pathologie et troubles mnésiques chez l'homme

Les données de la neuropsychologie humaine se basent sur le principe de dissociations simples et doubles pour soutenir l'existence de systèmes de mémoire multiples. Les accidents ou pathologies qui portent atteinte à une structure cérébrale et s'accompagnent de troubles mnésiques renseignent sur les substrats neuroanatomiques et le fonctionnement normal de la mémoire. Dans le syndrome de Korsakoff (carence en vitamine B1 souvent d'origine éthylique) où suite à une embolie de l'artère cérébrale postérieure par exemple, une déficience des structures diencephaliques de la ligne médiane, incluant les corps mamillaires, le noyau dorsomédian du thalamus ou le faisceau mamillo-thalamique peut apparaître. Elle cause une amnésie diencephalique, associée à des troubles sévères de mémoire épisodique (Gazzaniga, 2001). Les amnésies bitemporales conséquentes à une atteinte des structures temporales, dont l'amygdale, l'hippocampe et les structures corticales adjacentes, suite à des occlusions artérielles, des encéphalites herpétiques ou encore des crises d'épilepsie, sont également associées à de sévères troubles de mémoire déclarative (Gazzaniga, 2001). Comment ne pas évoquer le cas du célèbre patient H.M. décrit par Milner et Scoville en 1957 (Scoville and Milner, 2000), qui suite à une résection bilatérale du lobe temporal présente une amnésie déclarative rétrograde et antérograde sévère mais reste capable d'acquérir de nouvelles compétences motrices. Ces dichotomies entre capacités perdues et résiduelles, donna naissance à la notion de mémoire des habiletés dite mémoire procédurale, indépendante des structures temporales et diencephaliques de la ligne médiane. Ces dissociations ont depuis été confirmées chez des sujets sains qui réalisent des tâches mnésiques, grâce aux techniques de neuroimagerie fonctionnelle. Malgré des dissociations apparentes lors de la réalisation de tâches mnésiques distinctes, les systèmes de mémoire classiquement distingués peuvent collaborer lorsqu'ils sont évalués avec succès dans des paradigmes proches (Smith and Grossman, 2008; Voss and Paller, 2008).

3. Les systèmes de mémoire

3.1. Mémoire à court terme et mémoire à long terme

La dichotomie la plus simple dans l'étude des processus mnésiques fait référence à la durée de rétention de l'information. Celle-ci distingue une mémoire à court terme (MCT), dynamique et à durée limitée, de la mémoire à long-terme (MLT) persistante, dite de référence. Malgré son usage répandu, cette dichotomie est mal définie et ne repose sur aucun critère temporel consensus précis. Plusieurs visions s'opposent quant à la coopération entre systèmes de MCT et de MLT. Un mode de fonctionnement sériel a été proposé, où toute information sensorielle doit être stockée à court terme avant d'être consolidée pour devenir permanente (modèle modal de Atkinson shifrin, 1968), alors que d'autres théories soutiennent un mode de fonctionnement en parallèle, dans lequel le stockage à court ou long terme dépendrait de l'ampleur de l'encodage (modèle des niveaux de traitement, Gazzaniga, 2001). La mémoire de travail qui correspond à la manipulation utile de l'information pour la réalisation de la tâche (Baddeley, 1996), joue un rôle important dans les fonctions exécutives, et dépend du cortex préfrontal et de ses connexions sous-corticales (D'Esposito, 2007). La MCT correspond à la rétention temporaire d'informations nouvellement acquises ou restituées. La MLT regroupe plusieurs processus qu'il convient de distinguer: ceux-ci diffèrent à la fois par les mécanismes neurobiologiques et les substrats qui sous-tendent leur implémentation, et par la nature consciente ou inconsciente de leur rappel.

3.2. Mémoire déclarative et non-déclarative

Cette perspective sépare au sein de la MLT, la mémoire procédurale ou implicite, inconsciente, de la mémoire explicite ou déclarative, consciente (Squire, 1986). La simplification de la notion de mémoire procédurale à une mémoire des habiletés a été remise en question par Schacter et Tulving, qui suggèrent que les habiletés implicites, décrites comme le « savoir-faire » (« *know how* » en anglais ; Ryles, 1949) soient plus complexes que l'exécution de programmes mémorisés. Elles englobent certes des capacités motrices automatiques (comme conduire), qui deviennent rapidement des habitudes et dépendent principalement des structures striatales, mais également des capacités cognitives variées telles que l'amorçage perceptif, ou la capacité à faire une addition, qui dépendent de structures variées dont le néocortex. Finalement, la mémoire non-déclarative ou implicite, inclut également les capacités d'apprentissage associatif, dont plusieurs formes de conditionnement.

(cf. figure 6). La mémoire déclarative ou explicite tient son nom des tests neuropsychologiques réalisés chez l'homme, pour lesquels ce type de mémoire est évalué par une réponse verbale explicite et consciente qui relate les faits mémorisés. En psychologie, la mémoire déclarative est divisée en mémoire épisodique et en mémoire sémantique (Tulving, 1972). La première contient les informations associées aux faits accompagnant les événements, alors que la seconde se rapporte à la signification du contenu de l'information. Ces deux formes interdépendantes de mémoire déclarative mobilisent les mêmes structures du lobe temporal médian. La taxonomie des systèmes de mémoire chez l'homme et des principales structures s'y rapportant est résumée dans la figure 6 (Squire, 2004).

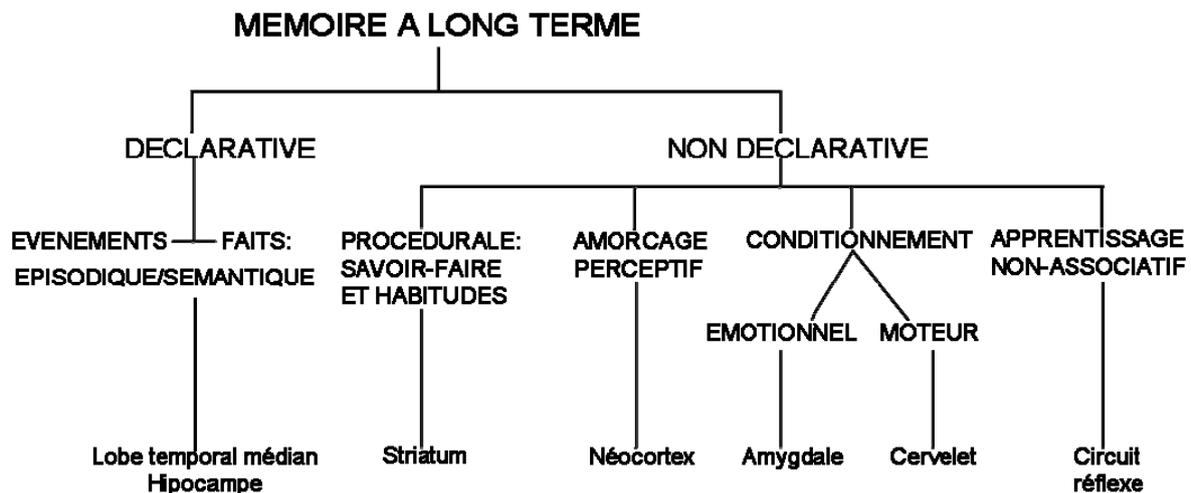


Figure 6: Taxonomie des systèmes de mémoire.

Vision actuelle de la taxonomie des systèmes multiples de mémoire à long terme (MLT), répartie en mémoire déclarative et non-déclarative. Leurs substrats *préférentiels* mais non suffisants sont indiqués en caractères minuscules. D'après Squire, 2004.

Pour des raisons évidentes, les critères qui définissent les systèmes de mémoire chez l'homme ne sont pas applicables à l'animal: comment aborder expérimentalement des systèmes de mémoire consciente ou inconsciente, déclarative ou non-déclarative? La classification au sein de la mémoire animale est ainsi moins bien établie que pour la mémoire humaine. La terminologie des systèmes de mémoire chez l'animal repose généralement sur la méthode expérimentale mise en œuvre pour son évaluation et sur les substrats dont elle dépend. La

notion de mémoire dépendante ou indépendante de l'hippocampe est ainsi couramment utilisée pour distinguer la mémoire implicite de la mémoire explicite.

4. Mémoire implicite

La mémoire implicite est une capacité résultant d'un apprentissage automatique qui dépend de la durée et de la quantité d'exposition à un stimulus. Elle englobe plusieurs systèmes d'apprentissages qui sont constitués d'un ensemble de substrats neuronaux hétérogènes dont le principal point commun est leur indépendance par rapport aux structures du lobe temporal médian (cf. Figure 6), dont l'hippocampe. La mémoire implicite (indépendante de l'hippocampe) se définit donc par opposition à la mémoire explicite (dépendante de l'hippocampe). Chez le rongeur, plusieurs procédures sont couramment utilisées pour évaluer la mémoire implicite.

4.1. Mémoire des habitudes et habiletés motrices

La mémoire procédurale résulte de l'association entre réponse comportementale, effectuée initialement au hasard, et ses conséquences (stimulus-réponse). Cette association est mise en évidence par les capacités d'apprentissage d'une réponse instrumentale pour obtenir une récompense (renforcement positif) ou éviter une punition (renforcement négatif). Chez le rongeur, le test de conditionnement de la boîte de Skinner est un exemple classique, dans lequel les rongeurs, préalablement privés de nourriture apprennent à appuyer sur un levier pour en obtenir. La mémoire associative est évaluée par la vitesse progressive de résolution du problème, et donc par la diminution de la latence d'exécution de la réponse instrumentale. Elle dépend essentiellement du striatum de la substance noire et du globus pallidus qui constituent les ganglions de la base, et de leurs connections avec le thalamus et le cortex moteur (Packard and Knowlton, 2002).

4.2. Mémoire émotionnelle

La mémoire émotionnelle résulte de la mémorisation d'un évènement à caractère émotionnel (positif ou négatif). Elle peut être mise en évidence grâce à un conditionnement aversif, dans lequel un stimulus neutre est associé à un stimulus aversif. La nature implicite ou explicite de ce type de mémoire n'est pas clairement établie (Kolb, 2002). Chez l'homme, le

chevauchement entre le rappel implicite et explicite d'une expérience émotionnelle aversive a été élégamment mis en évidence: suite à un conditionnement aversif, des sujets sains présentent des réponses autonomiques de peur en réponse au stimulus neutre (mémoire implicite), et sont capables d'expliquer l'origine de cette peur (mémoire explicite). Des sujets présentant une lésion bilatérale sélective de l'hippocampe acquièrent des réponses de peur conditionnée, sans connaître les faits et les raisons accompagnant cette réponse. A l'inverse, la lésion de l'amygdale entraîne des déficits de peur conditionnée (mesures autonomiques), mais non des faits s'y rapportant (Bechara et al., 1995). Il a ainsi été suggéré que l'amygdale soit le substrat central de la mémoire émotionnelle associative automatique implicite, et que le recrutement de l'hippocampe soit nécessaire à la reconstitution des faits de l'événement émotionnel (explicite).

Évaluation expérimentale de la mémoire émotionnelle

Chez le rongeur, la mémoire émotionnelle est classiquement évaluée lors d'un conditionnement aversif de type pavlovien. L'animal explore librement un contexte pendant quelques minutes, puis un stimulus conditionnel (SC= son) est présenté en association avec un stimulus inconditionnel aversif (SI= choc électrique) à plusieurs reprises. Après un certain délai, l'animal est réexposé au SC ou au contexte du conditionnement et l'expression comportementale de la réponse de peur, l'immobilité tonique (*freezing*) est mesurée. L'immobilité en réponse au SC reflète la mémoire émotionnelle élémentaire ou discrète alors que l'immobilité en réponse au contexte de conditionnement reflète une mémoire émotionnelle contextuelle, indiquant qu'une association avec le SI a été établie lors du conditionnement.

Substrats de la mémoire émotionnelle: rôle central de l'amygdale

Les substrats de la mémoire émotionnelle ont été abondamment étudiés. Au sein d'un réseau de structures comprenant l'hypothalamus, le thalamus et les structures corticales primaires et associatives, l'amygdale est aujourd'hui considérée comme centrale dans les processus de mémoire émotionnelle (Kim and Jung, 2006; Pape and Stork, 2003; Pare et al., 2004). Elle est connectée de manière réciproque à ces structures cibles par deux voies de projection:

- ⇒ La voie amygdalofuge ventrale qui la relie au tronc cérébral, au noyau mediodorsal du thalamus, au noyau latéral de l'hypothalamus, à l'hippocampe (subiculum) aux structures corticales insulaire, cingulaire et préfrontale.
- ⇒ La voie de la strie terminale qui la relie au noyau accumbens, à l'hypothalamus et au noyau du lit de la strie terminale principalement.

L'amygdale joue un rôle essentiel dans les médiations des émotions innées (Phelps and LeDoux, 2005) et sa connectivité avec les structures du lobe temporal médian, lui confère une position privilégiée pour attribuer une signification émotionnelle à un événement (LeDoux, 2003) et produire une réponse comportementale intégrée. Le couple Blanchard et Blanchard (Blanchard and Blanchard, 1972) précisèrent le rôle crucial de l'amygdale dans les réponses émotionnelles innées en montrant que la lésion globale de l'amygdale diminue la réponse de peur innée de rats en milieu semi naturel face à un prédateur réel (réponse de peur) ou à son odeur (réponse anxieuse). Le complexe amygdaloïde est constitué de deux ensembles, les noyaux cortico-médiaux et baso-latéraux. Le premier inclut les noyaux cortical, médial et central et le deuxième les noyaux basal, latéral et accessoire. De manière simplifiée, la division baso-latérale (BLA) constitue la principale voie d'entrée sensorielle, alors que l'amygdale centrale (CeA) constitue le noyau principal de sortie. Les noyaux basal et latéral de l'amygdale, ne semblent pas nécessaires au développement d'une réponse de peur innée (Walker and Davis, 1997) mais projette sur le noyau central, véritable déclencheur des réponses émotionnelles (Davis, 1992). Celui-ci active les structures effectrices qui contrôlent l'expression des comportements de peur (hypothalamus, substance grise périaqueducule, cf. figure 7). Sa stimulation électrique reproduit d'ailleurs la panoplie des réponses de peur observée chez l'animal (Davis and Whalen, 2001).

L'amygdale joue également un rôle important dans le développement de la peur conditionnée. La BLA est la principale interface entre les différentes informations sensorielles (auditive du SC, somatosensorielle du SI) qui y convergent, soit directement depuis les noyaux sensoriels thalamiques (voie courte), soit indirectement depuis les structures corticales (voie longue, cf. figure 7). L'activité neuronale du noyau latéral est potentialisée suite à un conditionnement, particulièrement au niveau des synapses où convergent les voies qui véhiculent les informations concernant le SC et le SI (Rodrigues et al., 2004). Le noyau basolatéral est considéré comme le siège des processus d'acquisition et de stockage permettant

l'établissement d'associations durables (Schafe et al., 2005). Lors du conditionnement, l'amygdale sous-tendrait ainsi les processus associatifs qui permettent l'association du SC et du contexte au SI (Huff and Rudy, 2004). L'association entre SI et contexte de conditionnement, qui a lieu ici en arrière-plan par rapport au conditionnement discret, recrute également la formation hippocampique (Anagnostaras et al., 2001; Fanselow, 2000; Phillips and LeDoux, 1992). La mémoire émotionnelle contextuelle qui engage l'hippocampe est actuellement proposée comme une forme de mémoire explicite (cf. mémoire contextuelle, paragraphe 7.3).

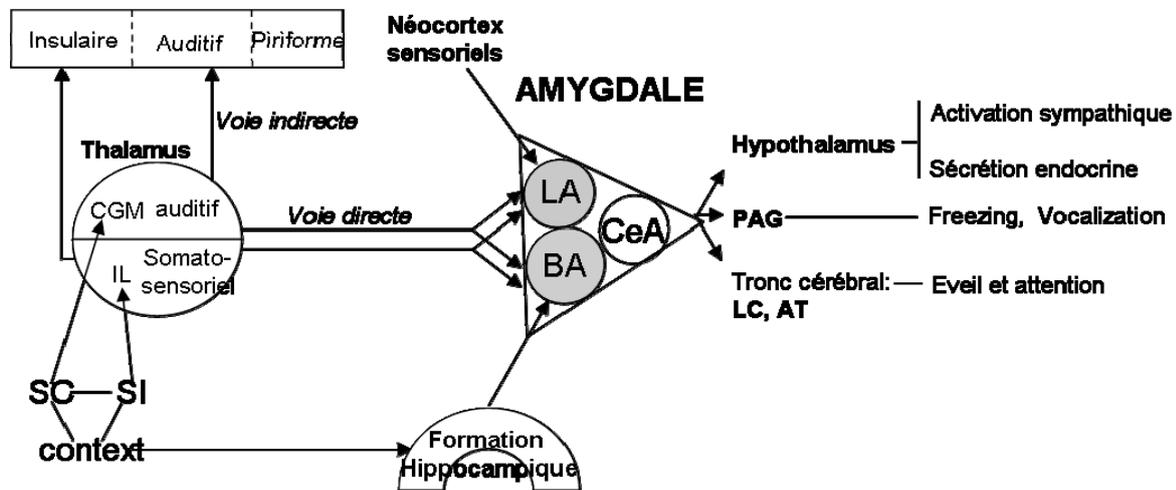


Figure 7: Schéma des principaux circuits impliqués dans l'acquisition de la peur conditionnée.

Le complexe amygdalien reçoit et intègre l'information sensorielle par plusieurs voies. L'information sensorielle parvient directement des noyaux thalamiques auditifs (CGM: corps genouillé médian) et somatosensoriels (IL: intra-laminaire) à la division baso-latérale de l'amygdale (en gris), et de manière indirecte, suite au traitement cortical primaire (insulaire, auditif) par le noyau latéral (LA). L'information contextuelle transite par la formation hippocampique (cortex enthorinal, CA1, subiculum) qui projette sur le noyau basal (BA). La division basolatérale (BA+LA) est un site de convergence de l'information permettant la formation des associations entre stimuli conditionnel sonore (SC), inconditionnel somato-sensoriel (SI) et contexte de conditionnement. L'amygdale centrale (CeA) projette vers les structures effectrices des réponses de peur, l'hypothalamus, la substance grise périacqueducale (PAG) et les noyaux aminergiques du tronc cérébral, le locus ceruleus (LC) et l'aire tegmentale (AT). **Adapté de Maren, 2001 et Fanselow, 2005.**

5. Mémoire explicite

La mémoire explicite dépend des structures du lobe temporal médian qui comprend les aires d'association néocorticales, la région parahippocampique (gyrus parahippocampique, cortex péri- et entorhinal) et la formation hippocampique. Le rôle de l'hippocampe dans la mémoire explicite demeure une question centrale dans l'étude des processus mnésiques.

6. La formation hippocampique

La formation hippocampique regroupe un ensemble de structures telencéphaliques de l'archéocortex, phylogénétiquement plus ancien, qui s'est replié et enfoui sous le lobe temporal (Amaral and Witter, 1989). Elle est symétrique et s'étend de la partie haute et interne du lobe temporal et s'enroule d'avant en arrière jusqu'à la partie postérieure et ventrale du corps calleux chez l'homme. L'hippocampe tient son nom de sa forme enroulée qui rappelle celle de l'animal marin (Giuolio Aranzi, environ 1600, cf. figure 8). Chez le rongeur, l'hippocampe est en position dorsale et médiane dans sa partie antérieure et devient plus latéral dans sa partie postérieure. Cet axe longitudinal dorso-ventral est aussi appelé axe septo-temporal.

6.1. Organisation anatomique et cytoarchitectonique

La formation hippocampique inclut en plus de l'hippocampe, le gyrus denté, le subiculum, les pré- et parasubiculum. L'hippocampe associé au subiculum d'une part et le gyrus denté d'autre part constituent deux ensembles cellulaires distincts, en forme de « C » qui s'interpénètrent. L'hippocampe dans sa définition stricte comprend trois divisions : les champs ammoniques ou cornes d'Ammon CA1 à CA4, le champ CA2 étant plus restreint, et le champ CA4, correspond à la région polymorphe du gyrus denté (Lopes da Silva et al., 1990).

Le gyrus denté est formé de trois couches (structure allocorticale): une couche moléculaire principalement dendritique, une couche granulaire et une couche polymorphe interne ou hilus, contenant plusieurs types neuronaux dont les cellules moussues et des interneurons. L'organisation de l'hippocampe est plus complexe car il est constitué de sept couches distinctes (Amaral and Witter, 1989; Lopes da Silva et al., 1990). La distinction est basée sur la présence ou non des corps cellulaires pyramidaux, des axones ou des dendrites de ces

cellules. Ces champs ammoniques contiennent essentiellement des cellules pyramidales dont la taille diffère selon le champ : les cellules de CA3 sont des cellules pyramidales géantes tandis que les cellules de CA1 sont plus petites. Le subiculum, le présubiculum et le parasubiculum contiennent également une couche pyramidale. Ils constituent la principale voie de sortie de l'information traitée par la formation hippocampique. Le cortex enthorinal constitue quant à lui la principale voie d'entrée de l'information. Comme l'ensemble du néocortex il est formé de six couches.

6.2. Circuit interne de la formation hippocampique

L'organisation interne de la formation hippocampique fait partie des circuits neuronaux les mieux caractérisés (Amaral and Witter, 1989). Elle est constituée d'un circuit trisynaptique orienté transversalement par rapport à l'axe septo-temporal de l'hippocampe, remarquable pour ses qualités unidirectionnelles rares au sein du cerveau. (cf. figure 8, Gordon 2003). On distingue les connexions séquentielles suivantes:

- ⇒ Les projections en provenance du cortex enthorinal traversent le subiculum et la fissure hippocampique pour atteindre les cellules granulaires du gyrus denté : il s'agit de *la voie perforante*. Le cortex enthorinal projette aussi directement sur les cornes d'Ammon.
- ⇒ Les cellules granulaires, dont les axones constituent *les fibres moussues*, font synapse sur les dendrites des neurones pyramidaux du champ CA3.
- ⇒ Les cellules pyramidales du champ CA3 font synapse sur les dendrites des neurones pyramidaux du champ CA1 par les *collatérales de Schaeffer*.

Par ailleurs, au sein de chacune des structures hippocampiques, les connexions sont plus complexes. Il existe de nombreux interneurons locaux qui vont permettre la communication entre neurones d'une même région, particulièrement au niveau du champ CA3. D'autres possèdent des arborisations plus étendues dirigées entre régions, aussi bien transversalement que longitudinalement, qui ajoutent une troisième dimension à cette organisation.

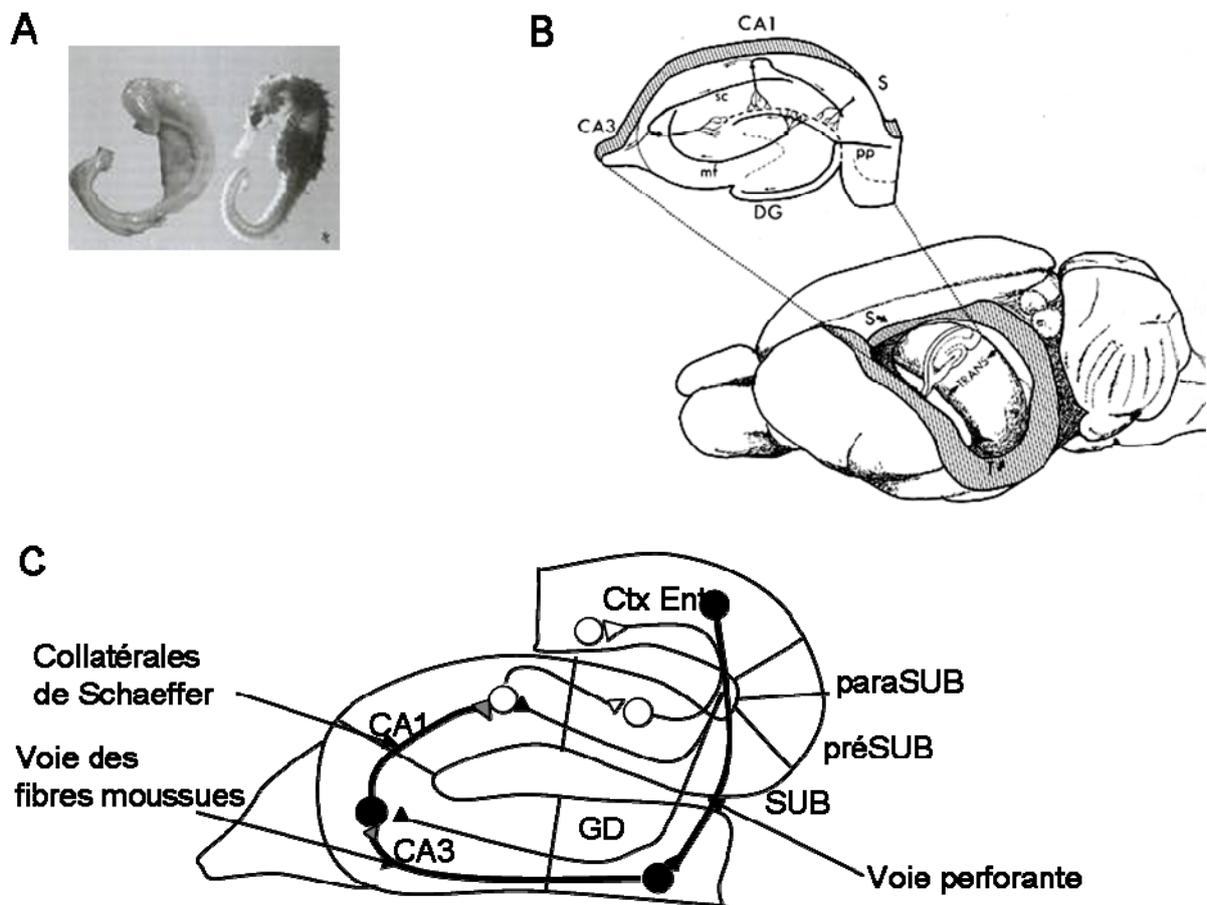


Figure 8: La formation hippocampique.

L'hippocampe tient son nom de la ressemblance de cette formation chez l'homme avec l'animal marin (A). Chez le rongeur, sa forme est moins sinueuse, et son axe longitudinal s'oriente selon une direction septo(S)-temporale(T), ou dorso-ventrale (B). Son organisation transversale trisynaptique (B et C). Pp: voie perforante, DG: gyrus denté, mf: voie des fibres moussues, CA3: champ ammonique 3, sc: Collatérales de Schaeffer, CA1: champ ammonique 1, S: subiculum. **D'après Shepherd, 2003 et Andersen 2006.**

6.3. Connexions hippocampiques extrinsèques

Les afférences et efférences subcorticales de la formation hippocampique transitent par un système de fibre appelé fimbria-fornix. Les connexions réciproques avec la formation hippocampique controlatérale forment les commissures dorsales et ventrales.

La formation hippocampique reçoit des informations présentées dans leur ordre d'importance, en provenance :

- Des cortex cingulaire et préfrontal et piriforme par les cortex peri-rhinal, parahippocampiques au travers de la voie d'entrée majeure : le cortex enthorinal.
- Du septum médian et de la bande diagonale de Broca qui empruntent les voies infra- (fimbria-fornix) et supra-calleuse pour constituer la voie septo-hippocampique qui innerve le CA1, le CA3 et le gyrus denté.
- Le thalamus (noyaux antérieurs, intralaminaires et de la ligne médiane) projette vers le subiculum par la capsule interne.
- L'hypothalamus.
- L'amygdale basolatérale projette vers le subiculum et l'hippocampe.
- Du tronc cérébral : locus coeruleus, noyau du raphé médian, aire tegmentale ventrale.

La formation hippocampique émet des projections vers :

- Le cortex frontal, pré et infralimbique.
- Les corps mamillaires par le fornix.
- Les noyaux antérieurs et ventro- et dorsomédians de l'hypothalamus (par plusieurs voies).
- Le septum latéral par le fornix.
- Le complexe amygdalien.
- Le thalamus par l'intermédiaire des corps mamillaires.

6.4. Différences de connectivité selon l'axe septo-temporal

Chez le rongeur l'hippocampe occupe un volume important dans le cerveau et la partie dorsale se définit comme 50% du volume à partir du pôle septal. Il existe des différences graduelles de connectivité au long de l'axe septo-temporal (Bast, 2007) qui facilitent l'intégration d'informations de natures différentes et révèlent une possible ségrégation fonctionnelle entre hippocampe dorsal et ventral (Bannerman et al., 2004). En effet, l'influx d'information à caractère visuo-spatial qui transite par le cortex enthorinal atteint surtout la partie dorsale (2/3 du volume) de l'hippocampe, alors que l'influx olfactif est distribué de manière homogène sur l'intégralité de la structure. Par ailleurs, des différences apparaissent également au niveau des afférences : les projections issues de la partie ventrale de

l'hippocampe atteignent préférentiellement le cortex préfrontal et les structures subcorticales telles que l'amygdale et le BNST, alors que la partie dorsale projette plus vers le complexe mamillaire (Jay and Witter, 1991; Verwer et al., 1997).

6.5. Neurochimie de l'hippocampe

Au sein des connexions intrahippocampiques excitatrices majeures formées par la voie perforante, les fibres moussues et les collatérales de Schaffer, le neurotransmetteur principal est le glutamate, synthétisé par les neurones pyramidaux et granulaires. L'acide gamma amino-butyrique ou GABA, principal neurotransmetteur inhibiteur est quant à lui largement présent au niveau des interneurons qui rythment et synchronisent cette transmission excitatrice. Plus rarement, on retrouve au sein de la formation des interneurons à acétylcholine. Les nombreuses connexions extrahippocampiques véhiculent une grande diversité de neurotransmetteurs (jusqu'à la formation hippocampique (Lopes da Silva et al., 1990). Les afférences majeures sont surtout glutamatergiques en provenance entre autre du cortex et de l'amygdale et celles issues de la région septale délivrent du GABA et de l'acétylcholine.

A ces trois systèmes de neurotransmetteurs principaux, il faut ajouter de multiples autres neuromodulateurs qui régulent plus finement l'activité neuronale. Ainsi, on trouve au sein de l'hippocampe des terminaisons monoaminergiques issues du tronc cérébral qui délivrent de la sérotonine en provenance des noyaux du raphé, de la noradrénaline du locus coeruleus ou encore de la dopamine provenant de l'aire tegmentale ventrale ainsi que de l'histamine. D'autres modulateurs lipidiques comme les stéroïdes (sexuels et corticostéroïdes) ou les cannabinoïdes participent également à la régulation de la transmission hippocampique. Finalement, de nombreux neuropeptides (ex: la vasopressine, l'orexine, la cholécystokinine, la galanine, le neuropeptide Y, la substance P, le CRF, les peptides opioïdes) dont la N/OFQ sont présents dans l'hippocampe, qu'ils y soient délivrés par des fibres de projections ou synthétisés localement.

6.6. Système nociceptinergique hippocampique

Le récepteur NOP est présent dans l'ensemble des structures de la formation hippocampique, sauf au niveau du pré- et parasubiculum (Neal et al., 1999a). Sa présence fonctionnelle a été démontrée dans les cellules pyramidales et granulaires (en culture cellulaire ou en préparations en tranches). Des propriétés d'autorécepteur sont également possibles, en accord avec la colocalisation des messagers du récepteur NOP et de la N/OFQ dans les cellules pyramidales (Wang et al., 2000).

Le chevauchement entre l'expression de la ppN/OFQ et de la N/OFQ au sein de l'hippocampe renforce la proposition d'une synthèse locale de la N/OFQ. La nociceptine serait contenue dans des vésicules à coeur dense co-libérées au niveau des synapses GABAergiques (interneurones) et/ou des synapses des fibres moussues. Très peu d'informations sont actuellement disponibles quant aux types cellulaires synthétisant la nociceptine. Une étude visant à éclaircir le potentiel anti-épileptogène de la N/OFQ décrit une immunoreactivité de N/OFQ dans le neuropile des différentes couches des CA1-CA3 et du DG, ainsi qu'un marquage dense au niveau des couches pyramidale et granulaire, dans le champ CA1 et le DG, respectivement. Dans le DG, des cellules « de type interneurones » sont immunoréactives dans les couches moléculaire et polymorphe mais leur phénotype n'a pas été réellement démontré (Gutierrez et al., 2001). Récemment Bongsebandu et coll (Bongsebandhu-phubhakdi and Manabe, 2007) ont mis en évidence la libération endogène de N/OFQ par des interneurones faisant synapse sur les neurones pyramidaux du champ CA1 en réponse à une stimulation tétanique. Le récepteur NOP est présent dans l'ensemble des structures de la formation hippocampique, sauf au niveau du pré- et parasubiculum, et serait particulièrement forte au niveau du gyrus denté (Houtani et al., 2000). Sa présence fonctionnelle a été démontrée dans les cellules pyramidales (Bongsebandhu-phubhakdi and Manabe, 2007) et granulaires (Houtani et al., 2000), en culture cellulaire ou en préparations en tranches.

7. Les théories de la fonction hippocampique

7.1. Le modèle de Gray et Mac Naughton

Gray et MacNaughton proposent que le septum et l'hippocampe constituent une entité fonctionnelle appelé système septo-hippocampique, dont le rôle principal ne serait pas cognitif mais émotionnel (Gray and McNaughton, 1996). Ils proposent que ce système soit voué à l'inhibition comportementale, dont les dysfonctionnements seraient à l'origine des troubles émotionnels. Ce système peut être activé par la nouveauté, par des stimuli qui provoquent une peur innée, ou par des stimuli prédisant des situations aversives qui déclenchent des réponses de peur conditionnée. Selon Gray, la fonction de l'hippocampe serait de comparer les différentes entrées, externes ou mémorisés, et d'en évaluer les conséquences sur la situation par rapport au but recherché, pour ensuite émettre une réponse comportementale adaptée au travers des structures effectrices. Les réponses comportementales générées par l'activation de ce système inhibiteur seraient alors de deux types majeurs: les réponses anxieuses, qui résultent des comportements d'approche face à un danger potentiel et sont sensibles aux anxiolytiques, et les réponses de peur, qui résultent des comportements d'évitement face à un danger réel (McNaughton and Corr, 2004).

7.2. La théorie de la mémoire spatiale

En 1978, Nadel et O'Keefe éditent un livre intitulé « L'hippocampe en tant que carte cognitive » où ils énoncent la première version de leur influente « hypothèse des cartes cognitives spatiales » qui stipule que l'hippocampe joue un rôle crucial dans l'encodage, le stockage et la restitution des représentations de l'espace. Ils s'appuient sur deux ensembles de données majeurs : la découverte des cellules de lieu et la nécessité de l'intégrité de la formation hippocampique pour la réalisation de tâches de mémoire spatiale. Les cellules de lieu sont des neurones pyramidaux hippocampiques dont l'activité unitaire est étroitement corrélée avec le positionnement de l'animal dans un espace donné (O'Keefe and Dostrovsky, 1971). Cette théorie propose que la représentation de l'espace soit stockée, en exemplaires multiples (*multiple trace theory*) au sein de l'hippocampe et accessible à d'autres structures lors du guidage et de la navigation (système des taxons). Des lésions de la formation hippocampique (Jarrard, 1978; Morris et al., 1982; Sutherland et al., 1983) ou plus sélectivement de ses régions discrètes ou de leur voies de connexions (Cassel and Kelche, 1989) perturbent certaines modalités de la navigation spatiale, qui sont évaluées dans le test

du labyrinthe radial ou de la piscine de Morris. La fonction spatiale semble ainsi constituer une fonction majeure de l'hippocampe, à partir de laquelle plusieurs autres théories ont émergé.

7.3. Théories de la mémoire contextuelle

Représentation contextuelle

Rudy et Sutherland proposent une théorie de la fonction hippocampique dite « configurationnelle » (Rudy and Sutherland, 1989; Rudy and Sutherland, 1995). L'hippocampe permettrait la formation d'une représentation unique d'un environnement, à partir de la conjonction des différents stimuli élémentaires du contexte, sans pour autant être critique pour les associations simples ou discrètes entre deux stimuli. Ainsi une représentation complète du contexte peut être obtenue après échantillonnage de quelques éléments seulement, un phénomène appelé « complétion du motif » (Rudy and O'Reilly, 1999). Toutefois, la mémoire *contextuelle* dépasse la notion d'une *représentation spatiale du contexte*. Elle permet l'association de la représentation configurationnelle de l'environnement dans lequel l'évènement s'est produit (Myers and Gluck, 1994) ainsi que des états internes associés à l'évènement (*state dependency*). Ceux-ci peuvent être de nature motivationnelle, émotionnelle, cognitive (Bannerman et al., 2006; Kennedy and Shapiro, 2004) ou induits pharmacologiquement comme dans le cas de drogues d'abus telle que la morphine (Khajehpour et al., 2008). Cette mémoire contextuelle pourrait constituer un prérequis pour la mémoire déclarative épisodique (Smith and Mizumori, 2006).

Habituation contextuelle et détection de la nouveauté

L'habituation est un phénomène permettant de mettre en évidence la mémoire contextuelle. Elle se définit comme la diminution progressive de la réponse comportementale lors de l'exposition répétée à un même stimulus. C'est une forme de mémoire assez simple de type non associative. Chez le rongeur l'habituation à un contexte se manifeste par une diminution de l'activité exploratoire (Brodkin, 1999; Carey et al., 1998). La formation hippocampique et le cortex préfrontal et périrhinal ont été impliqués dans les processus de détection de la nouveauté chez l'homme et le rongeur (Brown and Aggleton, 2001; Kumaran and Maguire, 2007; Ranganath and Rainer, 2003; Yamaguchi et al., 2004). Considérant la contribution de

l'hippocampe à la détection de la nouveauté ainsi qu'à la formation de la représentation spatiale du contexte, il a été proposé comme structure comparatrice permettant l'évaluation des informations relatives au contexte à explorer par rapport à celles préalablement mémorisées {Kumaran, 2007 #263}. Il est intéressant de noter que cette notion de structure comparatrice rejoint la théorie établie par Gray (Gray and McNaughton, 1996) dans le contrôle de l'anxiété.

Évaluation expérimentale de la mémoire contextuelle

Le paradigme de conditionnement contextuel *de premier plan* est également largement utilisé étudier les processus de mémoire contextuelle. Un conditionnement de premier plan avec le contexte s'établit lorsqu'un stimulus aversif (SI) est délivré dans celui-ci, sans stimulus annonceur ou lorsque le SI n'est pas temporellement associé au SC. Ces processus associatifs dépendent de l'amygdale basolatérale qui reçoit à la fois l'information somatosensorielle du SI et l'information contextuelle provenant de l'hippocampe (Anagnostaras et al., 1999; Sutherland et al., 2008). Récemment, le recrutement de voies alternatives indépendantes de l'amygdale basolatérale ou de l'hippocampe a été mis en avant dans des cas particuliers de conditionnement contextuel intensif (Ponnusamy et al., 2007; Wiltgen et al., 2006). Ces données suggèrent que d'autres systèmes peuvent également être recrutés au cours des processus d'acquisition de la mémoire contextuelle aversive en fonction de l'importance de l'apprentissage, mais de manière moins rapide et moins efficace que les systèmes dédiés à ces tâches, rejoignant le concept de systèmes parallèles multiples de mémoire (White and McDonald, 2002). Le rôle limité dans le temps de l'hippocampe pour la tâche contextuelle (Kim and Fanselow, 1992) soutient également le concept de réseaux dynamiques dans le temps pour la formation des traces mnésiques et le stockage à long terme de la mémoire. Une condition est toutefois requise pour l'établissement d'une association entre choc et contexte: celle-ci n'a pas lieu lorsque l'animal subit le choc électrique immédiatement après son placement dans un contexte nouveau, mais seulement après exploration de celui-ci (Fanselow, 2000). Ce phénomène appelé « déficit de choc immédiat » (cf. figure 9) est attribué à un déficit d'association entre contexte et stimulus aversif, qui peut résulter d'un défaut de formation de la représentation intégrée du contexte ou à un défaut de représentation du SI. Une exposition préalable au contexte de conditionnement jusqu'à 1 mois avant le conditionnement, comble ce déficit et rétablit la peur conditionnée contextuelle chez le rat et la souris (Landeira-Fernandez et al., 2006; McHugh and Tonegawa, 2007). Dans cette

situation, lors du conditionnement, un délai minimum s'impose avant que le choc ne soit délivré, pour permettre la réactivation de la représentation intégrée du contexte établie lors de la pré-exposition. L'association s'établit alors entre la trace mnésique activée et le choc électrique (Rudy et al., 2002). Récemment, il a été proposé que la mémoire contextuelle qui s'établit lors d'un conditionnement contextuel pourrait s'apparenter à une mémoire « de type épisodique » (O'Brien and Sutherland, 2007; Rudy et al., 2004).

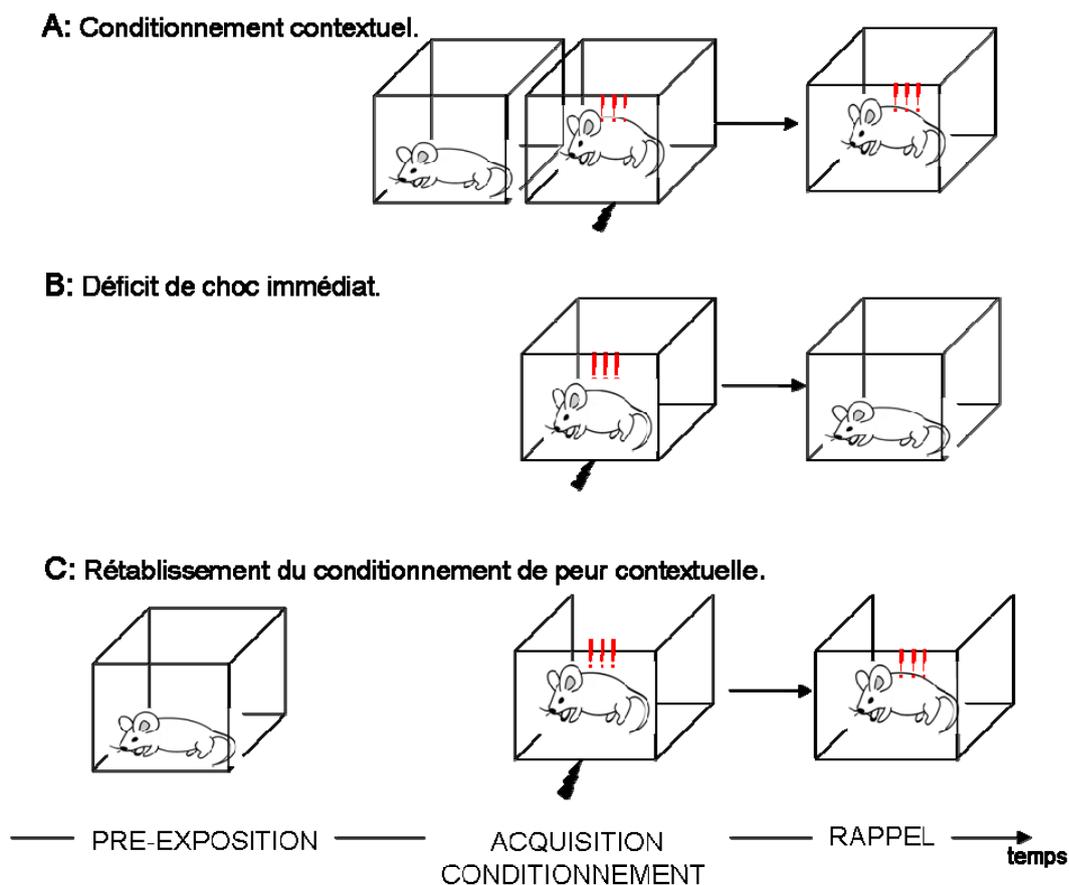


Figure 9: Evaluation de la mémoire contextuelle.

(A) Paradigme de conditionnement contextuel classique pendant lequel la représentation du contexte est associée au choc électrique pendant l'acquisition. Lors du rappel, la réponse émotionnelle de freezing (!!!) en réponse au contexte, évalue simultanément ces deux processus. (B) Paradigme de déficit de choc immédiat: en l'absence d'exploration du contexte précédant le choc électrique, la réponse de peur est fortement diminuée lors du rappel. (C) Rétablissement de la peur conditionnée contextuelle, grâce à l'effet facilitateur de la pré-exposition au contexte. Cette procédure distingue les processus de représentation du contexte lors de la pré-exposition et d'association au choc électrique lors de l'acquisition.

7.4. La théorie de la mémoire déclarative

Eichenbaum postule que le système hippocampique sous-tend une forme de mémoire déclarative chez l'animal comme chez l'homme (Bunsey and Eichenbaum, 1996), et propose une théorie de la fonction hippocampique dite « relationnelle » chez l'animal. Cette théorie généralise les fonctions décrites précédemment et propose que l'hippocampe puisse établir des relations entre différentes composantes ou événements de toutes natures (pas uniquement spatial). Ces relations entre les différents items en mémoire ($A > B$, $B > C$) sont plus que de simples représentations de leur liens ($A-B$, $B-C$) et sont flexibles, permettant l'établissement d'inférence ($A > C$). A chaque item mémorisé correspond un nœud d'information, et les relations entre items forment ainsi des « cartes de mémoire », (Shapiro and Eichenbaum, 1999) qui assurent la flexibilité du système, l'ensemble des informations étant restituables à partir d'une fraction d'indices dans un contexte différent de celui de l'acquisition.

La théorie de la mémoire déclarative définie par Cohen et Squire en 1980 concerne les faits et événements (épisodique), et propose que l'hippocampe soit le siège de la mémorisation d'informations concernant à la fois la nature et les caractéristiques intrinsèques d'un événement, ainsi que des informations spatiales et chronologiques liées à celui-ci. D'après Squire, la fonction première de l'hippocampe serait ainsi d'encoder et de consolider les informations nécessaires à la reconstitution complète de l'événement (Squire, 2004). Un ajustement récent de cette théorie ajoute une notion subjective de temps écoulé (*mental time travel*) et de flexibilité (Clayton et al., 2003; Zentall, 2006). Cette fonction est limitée dans le temps : une fois l'information consolidée, le stockage à long terme ou la restitution ne dépendrait plus principalement de l'hippocampe, mais préférentiellement des structures corticales avec lesquelles il entretient des liens étroits (théorie des niveaux de systèmes de la consolidation, Squire 1991 (Bontempi et al., 1999; Squire, 2004). Le concept de mémoire déclarative épisodique chez l'animal est très controversé, en raison de sa définition basée sur la récupération consciente de l'information et de son contenu verbalisable chez l'homme. Or aujourd'hui de plus en plus d'études suggèrent l'existence d'une mémoire « de type épisodique » chez le petit animal (Eacott and Norman, 2004; Eichenbaum and Fortin, 2005; Roberts et al., 2008), et mettent en évidence une mémoire hippocampique gérant les informations relatives à la nature, au lieu et à la chronologie des événements.

Évaluation expérimentale de la mémoire épisodique

Chez le singe, des paradigmes d'appariement différée d'échantillons familiers (*delayed non-matching to sample : DNMTS*) ont permis de modéliser les propriétés de syndromes amnésiques de type déclaratifs chez l'humain, et sont sensibles aux manipulations (lésion, pharmacologique, génétique) des structures du lobe temporal médian (Alvarez et al., 1994; Zola-Morgan et al., 1989). Les premières évidences de ce type de mémoire chez des espèces moins évoluées ont été apportées chez l'oiseau (Clayton and Dickinson, 1998) puis chez le rongeur (Ergorul and Eichenbaum, 2004).

Un paradigme très largement utilisé chez le rongeur est la tâche de reconnaissance d'objet, développée par Ennaceur et Delacour chez le rat (Ennaceur and Delacour, 1988), puis adaptée à la souris (Dodart et al., 1997). Dans la version classique de la reconnaissance d'objet en deux essais, la souris est premièrement habituée au contexte de l'expérience, puis exposée à deux objets identiques placés dans ce contexte (essai de familiarisation ou acquisition). Après un certain délai, lors de la deuxième étape, l'animal est à nouveau confronté à deux objets placés aux mêmes endroits, dont un familier et un nouveau (essai de discrimination ou rappel, cf. figure 10): si les caractéristiques de l'objet familier sont reconnues, l'objet nouveau sera détecté et spontanément préféré et son temps d'exploration sera supérieur à celui de l'objet familier. Le développement de tâches permettant la dissociation de la reconnaissance de l'objet ou de sa localisation (Dere et al., 2007; Ennaceur et al., 1997) ont mis en évidence que la mémoire de reconnaissance dépassait la simple rétention des caractéristiques intrinsèques (odeur, forme, taille, couleur etc...) des objets, et pouvait également inclure des informations contextuelles. En effet, selon le design du paradigme de reconnaissance (cf. figure 10), il a été montré qu'entre plusieurs objets familiers (même durée d'exploration lors de la familiarisation) les rongeurs sont capables de détecter un changement de la position spatiale et une chronologie de présentation des objets (Good et al., 2007).

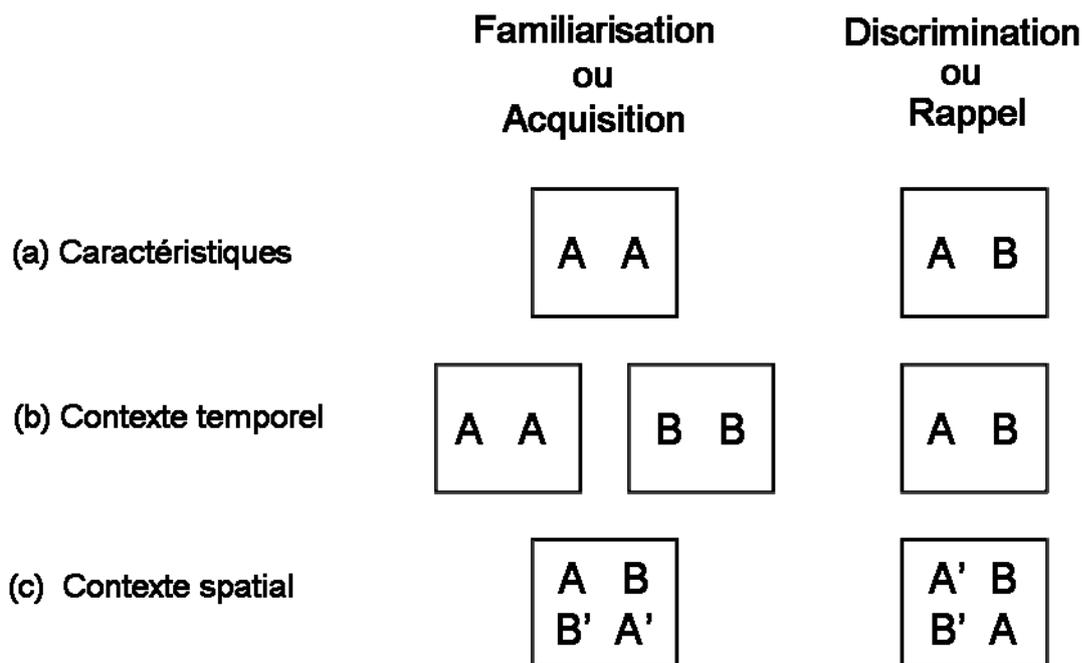


Figure 10: Paradigmes de reconnaissance d'objet.

Résumé schématique des différentes procédures de reconnaissance d'objets. La procédure classique en deux essais (a) est un protocole basé sur la familiarité des caractéristiques des objets. Les procédures (b) et (c) permettent de mettre en évidence les principales composantes d'une mémoire épisodique qui évaluent la reminiscence temporelle et spatiale. **Adapté d'après Good, 2007.**

Selon les demandes de la tâche, la reconnaissance pourrait mettre en jeu plusieurs stratégies, dites de familiarité et de recollection. Certains auteurs argumentent pour un modèle continu entre ces deux stratégies, et proposent qu'elles diffèrent uniquement par leur sensibilité, la familiarité étant engagée pour une mémoire « d'intensité » plus faible, alors que la recollection interviendrait lors d'une information multimodale, plus complexe. Une deuxième hypothèse propose une dissociation entre ces deux stratégies, qui engageraient des substrats neuronaux différents et seraient de ce fait considérées comme qualitativement et quantitativement distinctes. La stratégie dite « de recollection » permet la reconnaissance à partir des caractéristiques d'un objet ou d'une odeur de la position de l'objet mais également de l'ordre temporel de présentation de l'objet. Elle recruterait les fonctions hippocampiques (Aggleton and Brown, 2005; Clark et al., 2001), et est actuellement proposée comme un modèle rongeur de la mémoire épisodique (Dere et al., 2005; Eacott and Easton, 2007). La stratégie dite « de familiarité », reflèterait la notion de « déjà-vu » par la discrimination de

stimuli simples et recruterait essentiellement le cortex périrhinal mais serait indépendante de l'hippocampe (Brown, 2008; Good et al., 2007). La question de la contribution spécifique des différentes structures du lobe temporal médian à ces deux stratégies reste actuellement controversée, chez l'homme comme chez l'animal (Aggleton and Brown, 2006; Diana et al., 2007; Fortin et al., 2004).

Dans leur ensemble ces différentes théories de la fonction hippocampique convergent tout d'abord vers un rôle crucial de cette structure dans plusieurs formes de mémoire explicite spatiale, contextuelle et épisodique, sans pour autant la désigner comme seule imputée.

8. Bases moléculaires et cellulaires de la mémoire

8.1. En quête d'un « code biochimique » de la mémoire

Pour la première fois en 1959, des modifications biochimiques furent découvertes dans le cerveau de rats soumis à des apprentissages (Hyden, 1959). Ceci ouvrit la perspective incroyable de la découverte de molécules porteuses de la mémoire, codées par des ARN et protéines définis. Georges Ungar publia ainsi dans la revue *Nature* en 1965 (Ungar and OcegüeraNavarro, 1965) les propriétés de la scotophobine, protéine purifiée à partir d'extraits de cerveaux de rats qui avaient appris à éviter l'obscurité, qui une fois administrée à des rats naïfs, leur conférait ces mêmes capacités ! C'est à Strasbourg que Paul Mandel fit tester la scotophobine « à l'aveugle » et mis en évidence que les extraits purifiés induisaient intrinsèquement une aversion prononcée de l'obscurité chez le rongeur (Misslin, 1978). Les modifications moléculaires et cellulaires observées en réponse à un apprentissage furent par la suite interprétées plus simplement comme des marqueurs de l'activité neuronale nécessaire à la formation de la trace mnésique.

8.2. Mécanismes de plasticité

La neuroplasticité au sens large désigne les propriétés malléables du SNC qui le dote de la capacité à s'adapter en fonction de l'expérience. Au niveau structural on considère *la plasticité de réseaux* neuronaux : entre régions ou localement au sein d'une même structure dont le volume et le nombre de neurones peuvent évoluer ; *la plasticité neuronale*: la modification des connexions excitatrices et inhibitrices d'un neurone qui dépendent elle-

même du remodelage dendritique. Finalement le terme de *plasticité synaptique* introduit par Donald Hebb en 1949 est utilisé pour décrire les modifications d'efficacité synaptique dépendantes de l'activité neuronale. Ce mécanisme est aujourd'hui considéré comme un processus neuronal indispensable pour le stockage cellulaire de l'information.

Chez les organismes inférieurs comme l'aplysie, dotés de certaines formes de mémoire implicite, sous-tendues par des mécanismes de plasticité synaptique qui modifient l'efficacité synaptique, appelés facilitation ont été décrits. La facilitation pré-synaptique produit des modifications synaptiques à court terme alors que la facilitation post-synaptique induit des changements durables qui mènent respectivement à la modification du nombre de contacts synaptiques efficaces au sein du circuit neuronal responsable de la réponse comportementale étudiée (Kandel, 2000). Ces exemples de modification d'efficacité synaptique, mis en évidence dans des circuits monosynaptiques, sont certes réductionnistes mais constituent les mécanismes de base médiant également les formes d'apprentissage explicites (Barco et al., 2006).

L'hippocampe est doté de capacités de plasticité dépendante de l'activité synaptique, dont la potentialisation à long terme (Bliss and Collingridge, 1993; Bliss and Lomo, 1973), fondement des processus de mémoires plus complexes. Depuis, ce mécanisme a été décrit dans d'autres structures comme l'amygdale (Sigurdsson et al., 2007), le striatum ou le cortex enthorinal. La LTP comprend deux phases, une phase précoce et une phase tardive qui nécessite des étapes transcriptionnelle et traductionnelle. La phase précoce correspond à une modulation directe de l'efficacité de la transmission à la synapse considérée, alors que la phase tardive active, par l'intermédiaire des voies de signalisation intra-cellulaire, la transcription et la synthèse de nouvelles protéines (Kandel, 2001). Les synapses actives, à l'origine de l'activation de la signalisation intracellulaire requise pour l'expression de gènes, sont « marquées » (Frey and Morris, 1997) et constituent ainsi les sites privilégiés d'adressage des protéines nouvellement synthétisées et/ou de la régulation de la traduction locale. La dépression à long terme (LTD) est le processus homologue inhibiteur de la LTP et vise à diminuer l'efficacité synaptique. Initialement mis en évidence dans le cervelet, il a lieu également au sein de l'hippocampe où il interviendrait entre autre dans la flexibilité cognitive et les processus d'extinction mnésique (Massey and Bashir, 2007; Nicholls et al., 2008).

8.3. Les déterminants moléculaires et cellulaires de la plasticité synaptique

8.3.1. Les récepteurs du glutamate

Le glutamate est le neurotransmetteur exciteur majoritaire au sein du SNC, libéré par 50% des synapses centrales. Il est prépondérant dans les structures corticales ainsi qu'au sein du circuit exciteur trisynaptique de la formation hippocampique. Il agit au travers de ses récepteurs ionotropiques : les récepteurs AMPA, kainate (aussi appelés non-NMDA) et NMDA, nommés d'après leurs agonistes respectifs, et via ses récepteurs métabotropiques (mGluR). Au niveau d'une synapse excitatrice, les récepteurs AMPA contrôlent la transmission glutamatergique rapide et les récepteurs NMDA représentent les effecteurs de l'activité synaptique. Ces deux déterminants et jouent un rôle essentiel dans les phénomènes de plasticité.

Récepteur AMPA

L'antagonisme des récepteurs AMPA revient à l'inactivation complète de l'excitabilité de la structure cible et produit des déficits dans diverses tâches de mémoire (Riedel et al., 2003). Ils participent à plusieurs formes de plasticité à court et long terme dans l'hippocampe et l'amygdale. Leur activation induit une dépolarisation rapide et leur mode de régulation post-traductionnel conduit à leur recrutement à la membrane post-synaptique activée (Bredt and Nicoll, 2003).

Récepteur NMDA

Le récepteur NMDA (RNMDA) joue un rôle essentiel dans les processus mnésiques (Riedel et al., 2003). Le pore du RNMDA, formé par l'assemblage de 4 de ses sous-unités (NR1, NR2[A-D], NR3[A-B] comprenant obligatoirement une sous-unité NR1, est perméable aux ions Ca^{2+} , Na^+ et K^+ et bloqué à l'état basal par un ion Mg^{2+} (cf. figure 11). La coïncidence entre la libération pré-synaptique de glutamate, d'un co-agoniste (glycine) et de la dépolarisation post-synaptique suite à l'activation des récepteurs AMPA induit la levée du blocage par le magnésium. Ceci conduit à une entrée de Ca^{2+} dans l'élément post-synaptique qui servira de second messenger pour l'activation des voies de signalisations Ca^{2+} -dépendantes, dont la voie PKC (protéine kinase dépendante du calcium) (MacDonald et al., 2001) ou CamKII (Wayman et al., 2008). Il constitue ainsi un détecteur de l'activité neuronale soutenue, et engendre des modifications électriques et biochimiques au sein de l'élément post-

synaptique : c'est un déterminant moléculaire critique de la plasticité neuronale à long terme. Le récepteur NMDA est essentiel à l'induction de la LTP précoce et tardive dans l'hippocampe (Bliss and Collingridge, 1993), cependant d'autres formes de plasticité, indépendantes du récepteur NMDA ont été décrites (Kullmann and Lamsa, 2007).

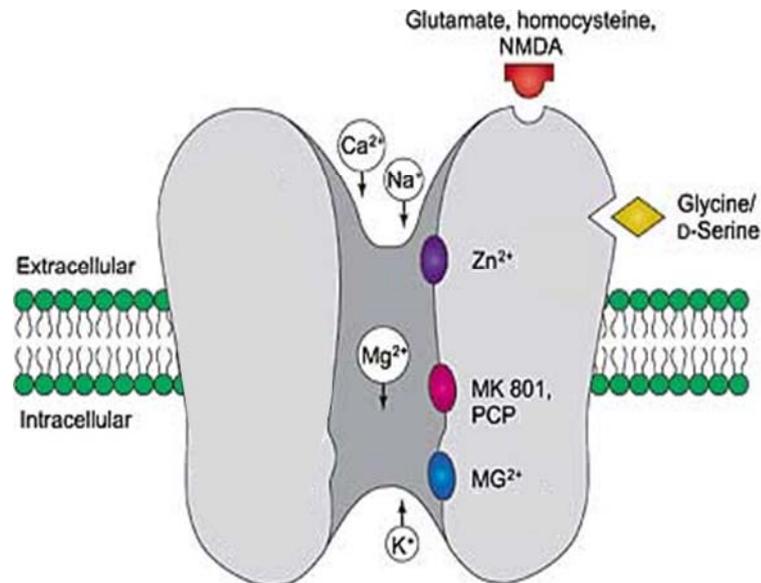


Figure 11: Pharmacologie du récepteur NMDA

De nombreux ligands pharmacologiques sont disponibles pour étudier la fonction du récepteur NMDA. Le D-AP5 et le R-CPP ciblent le site de fixation du glutamate et du NMDA. La d-sérine cible le site de la glycine. Le MK-801, la kétamine ciblent le site phencyclidine (PCP) au niveau du pore du canal. Le site de fixation du zinc est un site de modulation allostérique. **Image d'après smith 2002.**

De nombreux ligands pharmacologiques sont disponibles pour étudier sa fonction : certains agonistes ciblent le site de fixation du glutamate et du NMDA ou le site de la glycine comme la D-sérine. Certains antagonistes compétitifs comme le (R)-2-amino-phosphonopentanoate (AP5) ou le (R)-CPP ciblent également le site du NMDA alors que les antagonistes non compétitifs agissent au niveau du site phencyclidine au niveau du canal, comme le MK-801 (ou dizocilpine), la kétamine, la phencyclidine ou encore la mémantine (Kew and Kemp, 2005; Paoletti and Neyton, 2007). Il existe également un site de modulation allostérique au niveau du site de fixation du Zn²⁺ (cf. figure 11). L'inactivation pharmacologique par voie systémique du RNMDA bloque les processus de consolidation à long terme en mémoire spatiale, émotionnelle ou en mémoire de reconnaissance (Baker, 2002; Bardgett, 2003; de Lima, 2005). Réciproquement, son activation améliore la mémoire de reconnaissance et

facilite l'extinction de la peur conditionnée (Walker et al., 2002; Zlomuzica et al., 2007). Ces effets résultent d'une action combinée au sein des nombreuses régions exprimant le RNMDA (dont le cortex périrhinal, l'hippocampe et l'amygdale). Son inactivation hippocampique bloque la formation de la mémoire de reconnaissance de type épisodique, mais épargne son rappel (Day et al., 2003). Les techniques d'inactivation génétique restreinte à l'hippocampe ou à ses différents champs (Tsien et al., 1996), inductible dans le temps (Shimizu et al., 2000), confirment l'implication cruciale du RNMDA dans l'acquisition et la consolidation de plusieurs formes d'apprentissages (Silva, 2003).

8.3.2. La CamKII

La Ca^{2+} /calmoduline kinase II (CamKII), présente sous ses formes α et β dans les densités post-synaptiques de l'hippocampe, joue un rôle important dans la constance du signal suite à l'entrée transitoire de Ca^{2+} achevée. Elle est nécessaire à l'induction de la LTP et son activation est suffisante pour induire cette dernière dans l'hippocampe (Colbran and Brown, 2004). En effet, ses propriétés d'autophosphorylation persistantes lui valent la dénomination d'interrupteur moléculaire. Son activation directe par le RNMDA (Lisman and McIntyre, 2001) ou indirecte par l'intermédiaire de la Ca^{2+} /calmoduline conduit à la phosphorylation des récepteurs AMPA du glutamate, et augmente ainsi leur conductance et/ou leur recrutement à la membrane post-synaptique (Lisman and McIntyre, 2001). La mutation du site d'autophosphorylation de la $\text{CamKII}\alpha$, qui l'inactive ou au contraire l'active constitutivement, ou son invalidation génétique complète perturbe à la fois l'induction de la LTP dans le champ CA1 et les capacités d'apprentissage dans des tâches de mémoire qui dépendent de l'hippocampe (Silva, 2003).

8.3.3. l'AMP cyclique et la PKA

La production d'AMP (adénosine 3',5'-monophosphate) cyclique se fait par l'adénylate cyclase, dont l'activité est régulée principalement par les récepteurs couplés aux protéines G. L'AC est également sensible aux variations des taux calciques intracellulaires, par l'intermédiaire de la Ca^{2+} /Calmoduline kinase. L'AMPc agit en activant la PKA (protéine-kinase-dépendante-de-l'AMPc) qui module l'excitabilité neuronale et la plasticité à court terme par phosphorylation de canaux Ca^{2+} et K^+ . Elle active aussi directement l'activité transcriptionnelle requise pour la phase tardive, en phosphorylant le facteur de transcription CREB (cAMP-response-element-binding-protein). L'augmentation du taux d'AMPc, stimulé

par la forskolin ou par inhibition de phosphodiesterases, facilite la consolidation de la trace mnésique dans les tâches de conditionnement aversif (Bernabeu et al., 1997), et de reconnaissance d'objet (Bourtchuladze et al., 1994). Récemment une étude montre qu'une augmentation de 50% d'AMPC dans les neurones du cerveau antérieur, facilite la LTP et améliore la consolidation ainsi que le rappel, dans une tâche de reconnaissance d'objet chez la souris (Isiegas et al., 2008).

8.3.4. Les MAPK

Les voies de signalisation des MAPK

Les *mitogen activated protein kinases* ou protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK) constituent une famille de sérine/thréonine kinases, qui comprennent dans le tissu neuronal les *extracellular signal-regulated kinases* 1 et 2 (ERK1 ou p44MAPK, ERK2 ou p42MAPK), ERK3-8, les *c-jun N-terminal kinases* (JNK1, JNK2, JNK3) et les p38MAPK (α , β , δ , γ). Ces voies de signalisation qui transmettent et amplifient le signal des récepteurs membranaires jusqu'au noyau ont fait l'objet d'un intérêt florissant dans l'étude des bases moléculaires de l'apprentissage ces dix dernières années. Elles s'activent en réponse aux neurotransmetteurs et à la dépolarisation neuronale. La p38MAPK et la JNK appartiennent à la famille des kinases activées par le stress (*stress-activated-protein-kinases*, *SAPK*), impliquées dans la dégénérescence et la survie neuronale (Saporito et al., 2002). Cammarota et collaborateurs rapportent la nécessité de la p38MAPK et de JNK pour l'acquisition à court et long terme d'une tâche de conditionnement aversif (Bevilaqua et al., 2003; Bevilaqua et al., 2007), mais ces données sont controversées, plusieurs autres études n'impliquant pas directement ces kinases dans les processus mnésiques (Berman et al., 1998; Blum et al., 1999). La p38 kinase interviendrait dans certaines formes de plasticité de type LTD qui dépendent des récepteurs métabotropiques du glutamate dans l'hippocampe (Bolshakov et al., 2000; Zhu et al., 2002). Contrairement à p38MAPK et JNK, l'implication de ERK1/2 est largement acceptée dans les phénomènes d'apprentissage et de mémoire.

ERK

ERK est une kinase ubiquitaire qui régule la différenciation et la croissance cellulaire et son expression importante dans les neurones matures post-mitotiques est plutôt inattendue. La voie de signalisation ERK s'active en réponse à plusieurs stimuli extracellulaires : la

dépolarisation cellulaire (activité neuronale) ou l'activation de récepteurs membranaires à protéines G. L'activation de ERK1/2 passe par les GTPases Ras qui activent les Raf kinases (Braf, Raf1 dans les neurones) qui à leur tour phosphorylent MEK1/2 (MAP/ERK kinase), dont les seuls substrats connus sont ERK1/2 (cf. figure 12). Les inhibiteurs sélectifs de MEK : U0126, PD98059 et SL327, le seul capable de pénétrer à travers la barrière hémato-encéphalique, sont ainsi communément décrits comme inhibiteurs de ERK1/2. Cette cascade d'activation générale présente des subtilités selon le signal déclencheur. Le RNMDA peut activer Ras directement ou par l'intermédiaire de kinases dont l'activité dépend du Ca^{2+} (Wang et al., 2007) comme la CamKII (cf. paragraphe précédent) ou la protéine kinase Ca^{2+} -dépendante (PKC). La cible de Ras dans ces cas sera préférentiellement la kinase Raf1. Dans les neurones, des voies de signalisation parallèles, indépendantes du Ca^{2+} , peuvent coupler l'AMPA et la PKA aux MAPK par l'intermédiaire d'autres GTPases qui agissent plutôt sur B-Raf (Grewal et al., 2000; Morozov et al., 2003). (cf. Figure 12).

Les cibles cytoplasmiques de ERK

A l'état phosphorylé ERK1/2 peut agir directement sur la transmission synaptique en interagissant avec des protéines synaptiques membranaires, dont des canaux voltage-dépendants tel le canal potassique Kv4,2 (Yuan et al., 2002) ou des protéines requises pour la libération de vésicules synaptiques (synapsine : (Kushner et al., 2005). Une découverte majeure concernant le rôle de ERK1/2 dans la modulation de la transmission synaptique est son implication dans l'insertion de récepteurs AMPA à la membrane post-synaptique (Zhu et al., 2002) souvent attribuée directement à la CamKII. ERK1/2 intervient dans le remodelage structural des épines dendritiques de neurones en culture, de manière directe : par interaction avec des protéines du cytosquelette et d'échaffaudage comme la N-cadhérine, dont la dimérisation au niveau de l'hippocampe *in vivo*, est requise pour la formation de la mémoire contextuelle (Schrick et al., 2007). Elles affectent aussi la plasticité structurale de manière indirecte, au travers de la régulation locale de la traduction (Kelleher et al., 2004) ou de l'expression de gènes au sein du système nerveux central (Adams et al., 2000a).

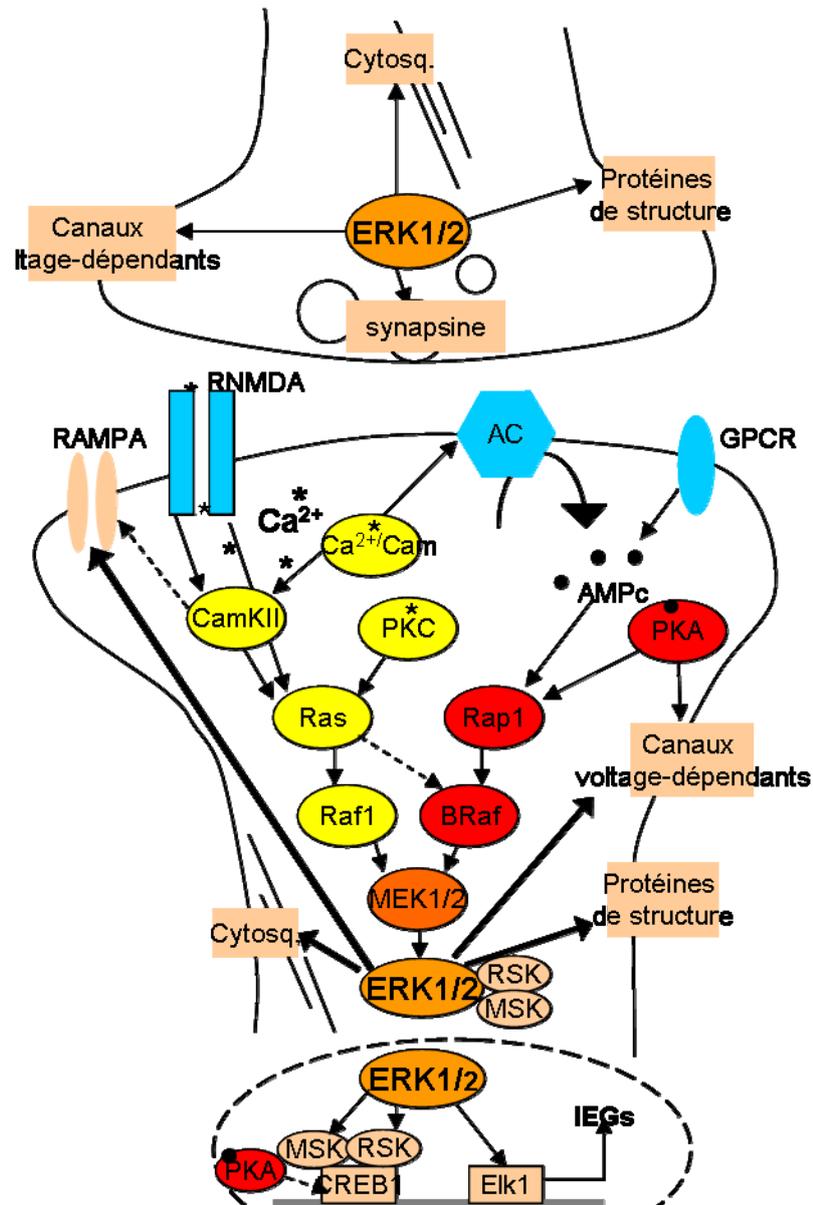


Figure 12: La voie de signalisation ERK1/2 dans la plasticité synaptique.

ERK1/2 est activé par l'activité synaptique permettant l'entrée de calcium au travers du récepteur NMDA (RNMDA) ou des canaux calciques voltages dépendants (jaune) ou par la stimulation de la production AMPc de l'adénylate cyclase (AC) par les recepteurs couplés aux protéines G (GPCR), par une voie PKA dépendante (rouge). Celles-ci convergent sur la signalisation Ras/Raf/MEK/ERK1/2 au niveau des Raf kinases. Une fois activé, ERK1/2 phosphoryle des substrats (orange clair) impliqués directement dans l'efficacité synaptique, ou dans les processus de plasticité à long terme, par l'intermédiaire d'une étape transcriptionnelle visant des gènes immédiats précoces (IEGs).

Les cibles nucléaires de ERK

Certains pools de ERK1/2 phosphorylé peuvent transloquer dans le noyau où ils activent des facteurs de transcription. Dans les neurones, l'activation de Elk-1 et CREB par ERK a été mise en évidence (Adams et al., 2000b; Davis et al., 2000; Impey et al., 1999; Sananbenesi et al., 2002). Un recrutement indirect de certains facteurs de transcription dont CREB a lieu en partie par l'intermédiaire d'autres kinases, cytoplasmiques et nucléaires au niveau de l'hippocampe: les RSK (ribosomal protein S6 kinase) et MSK (mitogen- and stress- activated kinases) (Lonze and Ginty, 2002), également impliquées dans les processus mnésiques (Chwang et al., 2007; Poirier et al., 2007).

ERK, plasticité et mémoire

ERK1/2 est nécessaire à l'induction de certaines formes de plasticité synaptique dans plusieurs régions cérébrales (Davis and Laroche, 2006), en particulier pour l'induction de la LTP dans l'hippocampe (Steward et al., 2007).

L'inhibition systémique de l'activation de ERK empêche la formation de la mémoire émotionnelle de peur (Atkins et al., 1998). La formation de la mémoire émotionnelle aversive élémentaire et la mémoire émotionnelle contextuelle requière l'activation de ERK dans l'amygdale (Duvarci et al., 2005; Schafe et al., 2000) et dans l'hippocampe (Ahi et al., 2004; Cammarota et al., 2000; Trifilieff et al., 2006). Leur activation rapide au niveau de l'hippocampe à été impliquée dans la mémoire émotionnelle contextuelle à court terme (Igaz et al., 2006), alors que des vagues successives d'activation dans l'amygdale et l'hippocampe semblent importantes pour la mémoire à plus long terme (Trifilieff et al., 2007; Trifilieff et al., 2006). L'isoforme ERK2 est plus spécifiquement impliqué dans la formation de la mémoire que l'isoforme ERK1 (Samuels et al., 2008; Satoh et al., 2007; Selcher et al., 2001). Dans le paradigme de reconnaissance d'objet, idéal pour étudier les substrats moléculaires de la mémoire, l'implication de ERK a également été mise en évidence. L'augmentation de la phosphorylation de ERK au niveau de l'hippocampe a été corrélée à une amélioration des capacités de reconnaissance chez la souris (Lewis et al., 2008; Maher et al., 2006; Wang et al., 2004). Par ailleurs, son inhibition intrahippocampique perturbe la reconnaissance à long terme sans affecter celle à court terme (Nagai et al., 2007). ERK1/2 serait également impliqué dans

la reconsolidation suite à une réexposition à l'objet au niveau de la formation hippocampique (Kelly et al., 2003).

L'ensemble de ces données indique une implication robuste de ERK dans les processus d'acquisition, de consolidation et de re-consolidation de la trace mnésique (Giovannini, 2006; Sweatt, 2004). Ces kinases sur lesquelles convergent des voies de signalisation essentielles aux processus de mémoire, jouent un rôle dans l'initiation de l'activité transcriptionnelle et traductionnelle, requise pour la formation de la MLT.

8.3.5. Les régulateurs de la transcription

Le rôle indispensable de la régulation de l'activité transcriptionnelle pour l'établissement de traces mnésiques durables requiert l'inhibition de facteurs répresseurs (CREB2) ainsi que l'activation de facteurs activateurs de la transcription (CREB). Le facteur de transcription CREB s'active en réponse à sa phosphorylation par la PKA ou les kinases effectrices de ERK1/2 ou encore la CamKIV. CREB permet la transcription d'environ 80 gènes dans le SNC (Lonze and Ginty, 2002) dont des gènes immédiats précoces (*immediate early genes* : IEGs). Chez la souris l'invalidation génétique nulle (Bourtchuladze et al., 1994) ou l'expression transgénique d'un dominant négatif de CREB (Pittenger et al., 2002) perturbent la LTP ainsi que la mémoire à long terme dans plusieurs tâches qui dépendent de l'hippocampe. Réciproquement, des manipulations génétiques ou pharmacologiques qui visent à surexprimer ou activer CREB facilitent les processus mnésiques (Silva et al., 1998).

Parmi les transcrits issus de l'activité transcriptionnelle de CREB, les IEG ont été largement utilisés pour cartographier l'activité neuronale. Ils comprennent d'autres facteurs de transcription comme *c-fos*, *zif-268* (aussi appelé *egr1*, *krox-24* et *NGFIA*) et des IEGs « effecteurs ». Les IEG effecteurs codent directement pour des protéines synaptiques impliquées dans la croissance neuronale et/ou le remodelage structural, comme le BDNF, *arc* (Miyashita et al., 2008) aussi dénommé *arg3.1*, et codent aussi pour des facteurs de signalisation comme nNOS, messenger rétrograde pouvant influencer la libération présynaptique de neurotransmetteurs (Guzowski, 2002). Au-delà de leurs propriétés de marqueurs, ces IEGs concrétisent le signal intracellulaire transduit, et sont nécessaires à la consolidation à long terme et la reconsolidation de plusieurs types de mémoire. Ils pourraient

servir de détecteurs d'activités coïncidentes, qui garderaient une trace des activations précédentes, entre vagues de signalisation successives et/ou réseaux neuronaux activés, permettant d'intégrer plus largement les stimuli encodés (notion de métaplasticité, (Clayton, 2000)).

III NOCICEPTINE/ORPHANINE FQ ET MEMOIRE

1. Mémoire de travail

L'implication du système nociceptinergique dans les processus de mémoire de travail est actuellement controversée. La N/OFQ administrée en i.c.v. diminue les performances de mémoire de travail évaluée dans le test du labyrinthe en Y (Hiramatsu and Inoue, 1999a; Hiramatsu and Inoue, 1999b). Dans une tâche de DNTMS le Ro64-6198 perturbe la mémoire de travail chez le rat sans affecter l'attention (Higgins et al., 2002), suggérant des effets spécifiques sur la mémoire à court terme. Cependant d'autres études rapportent que la N/OFQ n'affecte pas la mémoire de travail (Mamiya et al., 1999) et que les souris (KO NOP) présentent des performances similaires à celles de leurs contreparties sauvages (WT NOP) en mémoire de travail (Mamiya et al., 1999). Suite à l'administration i.c.v. de très faibles doses de N/OFQ, des améliorations des performances sont même décrites et la N/OFQ contrecarre les déficits induits par des antagonistes cholinergiques muscarinique (Hiramatsu and Inoue, 2000) ou nicotinique (Hiramatsu et al., 2008). Toutefois, ces effets ne sont pas bloqués par l'administration d'un antagoniste du récepteur NOP et sont donc indépendants de celui-ci. De plus, ces effets facilitateurs ont été reproduits avec des fragments actifs de N/OFQ, et pourraient de ce fait être induits par des métabolites de dégradation de la N/OFQ, qui agiraient sur d'autres cibles.

2. Mémoire spatiale

L'activation du système nociceptinergique affecte la mémoire spatiale. L'agoniste Ro64-6198 administré avant le test de la piscine de Morris perturbe la mémoire spatiale chez la souris (Higgins et al., 2002). L'injection intra-hippocampique bilatérale de N/OFQ perturbe la mémoire spatiale chez le rat (Sandin et al., 1997; Sandin et al., 2004), et ces effets sont bloqués par l'antagoniste du RNOP Nphe-N/OFQ(1-13)-NH₂ (Redrobe et al., 2000). De plus, les souris KO NOP apprennent plus rapidement que les souris WT NOP à trouver une plateforme dans le test de la piscine de Morris et présentent une meilleure rétention de sa localisation 4 jours après l'apprentissage (Manabe et al., 1998). Par contre les souris déficientes en précurseur de N/OFQ (KO ppN/OFQ) ne se comportent pas différemment des souris WT ppN/OFQ (Koster et al., 1999), ou ne présentent des améliorations très marginales de leurs performances, comparées aux KO N/OFQ (Higgins et al., 2002).

3. Mémoire émotionnelle aversive

Le système nociceptinergique affecte les processus de mémoire émotionnelle. La N/OFQ administrée par voie i.c.v. (Fornari et al., 2008; Mamiya et al., 2003) perturbe la mémoire émotionnelle contextuelle chez le rat et la souris, indiquant un rôle modulateur inhibiteur sur la formation de la mémoire émotionnelle. Dans la tâche d'évitement passif, elle diminue la latence d'entrée dans le compartiment associé au choc lors de l'étape de rétention, confirmant une perturbation des processus de la mémoire émotionnelle contextuelle (Hiramatsu and Inoue, 1999a; Hiramatsu and Inoue, 1999b; Mamiya et al., 1999; Nabeshima et al., 1999). Réciproquement, les souris ppN/OFQ KO exhibent une facilitation des comportements de peur conditionnée, lors d'une exposition combinée au stimulus conditionnel et au contexte de conditionnement (Higgins et al., 2002). Lorsque ces deux composantes sont évaluées séparément, la délétion du récepteur NOP améliore la rétention à long terme de la composante contextuelle (Manabe et al., 1998). Les substrats qui sous-tendent ces effets sont mal connus. Une seule étude rapporte que l'activation des récepteurs NOP de l'amygdale basolatérale, immédiatement après l'apprentissage, diminue les performances d'évitement passif, indiquant que ces récepteurs amygdalaires participent aux processus de consolidation de la mémoire émotionnelle (Roosendaal et al., 2007).

4. N/OFQ et plasticité synaptique

L'ensemble considérable de données converge vers une régulation des processus mnésiques par le système nociceptinergique et plusieurs groupes relatent des modifications d'efficacité synaptique. *Ex vivo*, la N/OFQ inhibe à la fois la transmission synaptique (effet pré-synaptique) et l'induction de la LTP (effet post-synaptique) dans les régions hippocampiques du CA1 et du DG, où elle diminue les courants excitateurs post-synaptique engendrés par le RNMDA mais non AMPA (Yu and Xie, 1998). De plus, le blocage du récepteur NOP par un antagoniste (UFP-101) augmente l'amplitude de la LTP (Bongsebandhu-phubhakdi and Manabe, 2007) ce qui suggère qu'une libération de N/OFQ endogène contribue à la réduction de la LTP dans le champ CA1. En accord avec ceci, une augmentation de l'amplitude de la LTP dans le champ CA1 a été montrée chez les souris KO NOP (Mamiya et al., 2003; Manabe et al., 1998). La N/OFQ affecte également d'autres formes de plasticité qui dépendent du RNMDA dans l'hippocampe, dont la LTD (Wei and Xie, 1999).

Les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation nociceptinergique de la mémoire, l'apprentissage et la plasticité n'ont pas été étudiés *in vivo*. Une seule étude aborde ceux-ci à ce jour, à partir de préparations *ex vivo* de cerveau de souris KO NOP. Sur préparation de synaptosomes issues de cerveau antérieur de souris KO NOP, l'activité des RNMDA et l'influx de Ca^{2+} induit par application de NMDA sont augmentés. En préparation sur tranche d'hippocampe, seule l'implication de la CamKII a été étudiée. Son activité est majorée chez les mutants KO NOP en réponse à l'application de NMDA. Chez la souris WT NOP, l'application de N/OFQ diminue la phosphorylation de la CamKII en réponse au NMDA, et cette inhibition est sensible à la toxine pertussique indiquant une contribution de la signalisation des protéines Gi/Go du récepteur NOP à ces effets (Mamiya et al., 2003). Les données électrophysiologiques laissent ainsi présager une modulation nociceptinergique des processus mnésiques par un mécanisme dépendant du RNMDA. Cependant, il est important de noter que les souris NOP KO présentent également des modifications de fonctionnalité d'autres systèmes de neurotransmetteurs, particulièrement une augmentation de la libération d'acétylcholine au niveau de l'hippocampe (Uezu et al., 2005). Celle-ci pourrait contribuer à la fois à l'amélioration des performances mnésiques de ces animaux et à la facilitation des processus moléculaires observés et ainsi biaiser les interprétations concernant la contribution des récepteurs NMDA à ces effets.

IV TRAVAIL DE THESE

La majeure partie de mon travail s'inscrit dans le cadre général de l'étude de la fonction du système nociceptinergique. Nous avons cherché à éclaircir, par des approches pharmacologiques et comportementales, le rôle et les mécanismes d'action de ce système dans les processus cognitifs et émotionnels chez la souris (1^{ère} partie). Au cours de ma dernière année de thèse, j'ai eu l'occasion de contribuer à un projet qui s'inscrit dans la thématique principale du laboratoire, qui s'intéresse au rôle des récepteurs aux opiacés dans les phénomènes de dépendance aux drogues d'abus. J'ai ainsi utilisé une approche comportementale chez la souris, permettant d'étudier les troubles des fonctions émotionnelles associés à l'état d'abstinence prolongée à la morphine (2^{ème} partie).

Une première étude visait à éclaircir l'influence du système nociceptinergique sur le développement de la peur apprise en utilisant une procédure de conditionnement aversif classique. Pour ceci nous avons étudié l'influence de l'agoniste Ro64-6198 du RNOP sur la formation de la mémoire émotionnelle aversive élémentaire et contextuelle. Afin de clarifier les mécanismes d'action de la N/OFQ nous avons également cherché à révéler l'existence d'une interaction fonctionnelle entre RNOP et RNMDA au niveau comportemental (Publication 1). Dans un deuxième temps, nous avons abordé la contribution du système nociceptinergique aux processus mnésiques qui sous-tendent la mémoire de reconnaissance. Afin de mieux comprendre les mécanismes d'action de ce système inhibiteur nous étudions les effets de l'activation du récepteur NOP, par la N/OFQ ou l'agoniste synthétique Ro64-6198, sur les capacités mnésiques de rétention et de rappel à court (3h) ou long terme (24h), dans une tâche de reconnaissance d'objet. Nous évaluons ensuite l'implication de l'hippocampe dorsal dans la médiation de ces effets amnésiques, par des manipulations pharmacologiques locales du RNOP. Compte tenu de l'implication de cette structure dans la régulation des fonctions émotionnelles, nous avons vérifié les conséquences de la stimulation du système nociceptinergique au niveau de l'hippocampe dorsal sur les comportements anxieux et les comportements de résignation. Finalement, nous avons cherché à révéler une interaction entre systèmes nociceptinergique et glutamatergique, et à savoir si les RNOP et RNMDA agissent sur des cibles moléculaires communes. Pour ceci nous évaluons l'implication des voies de signalisation des MAPK ERK et JNK au sein de l'hippocampe,

dans les processus mnésiques de reconnaissance à long terme, ainsi que l'influence des récepteurs NOP et NMDA sur celles-ci, en condition de repos ou d'apprentissage (Publication 2).

CONTRIBUTION EXPERIMENTALE ET DISCUSSION

**Implication du système nociceptinergique dans les processus mnésiques : Mécanismes
d'action de ses propriétés amnésiantes au sein de la formation hippocampique.**

CONTRIBUTION EXPERIMENTALE ET DISCUSSION

1. « Le système nociceptinergique perturbe l'acquisition de la peur conditionnée contextuelle en interagissant avec le système glutamatergique. »

1.1. Résumé en français

Notre étude vise à éclaircir l'influence du système nociceptinergique sur les processus d'acquisition de la mémoire émotionnelle aversive et à étudier la contribution du système glutamatergique à ces effets chez la souris. Pour ceci nous utilisons une procédure de conditionnement aversif classique associant à deux reprises un stimulus sonore conditionnel (SC) à un choc électrique (stimulus inconditionnel, SI). La peur conditionnée en réponse à la réexposition, après un délai de 24 heures, au SC (peur élémentaire), ou aux cages de conditionnement (peur contextuelle), est évaluée en pourcentage de temps passé en posture d'immobilité (*freezing*) et reflète la mémoire émotionnelle aversive. L'activation systémique des récepteurs NOP par l'agoniste Ro64-6198 (0,3 et 1 mg/kg) avant le conditionnement n'affecte pas l'acquisition de la peur conditionnée élémentaire, mais diminue le développement de la peur conditionnée contextuelle à la forte dose. Pour confirmer les effets amnésiques du Ro64-6198 en l'absence de choc, nous avons utilisé une procédure de déficit de choc immédiat (DCI). Celle-ci permet la dissociation temporelle du conditionnement contextuel en deux étapes : la première (phase de pré-exposition) consiste à familiariser l'animal avec la cage du conditionnement afin qu'il en acquière une représentation contextuelle; la deuxième (phase de conditionnement) consiste à appliquer le choc électrique cinq secondes après introduction de la souris dans le contexte 24 heures plus tard. L'omission de la première étape résulte en un déficit de conditionnement après la présentation du choc, empêchant la formation de la mémoire émotionnelle contextuelle. L'administration de Ro64-6198 avant la pré-exposition induit un DCI. Compte tenu du rôle majeur des récepteurs du glutamate de type NMDA (RNMDA), particulièrement hippocampiques dans la formation de la mémoire contextuelle, nous avons postulé que l'activation des récepteurs NOP pourrait s'opposer aux effets facilitateurs de ce récepteur. En effet, le blocage du RNMDA par le MK-801, (0,03 et 0,1 mg/kg) administré avant le conditionnement classique, perturbe l'acquisition de la peur conditionnée contextuelle et épargne la peur conditionnée élémentaire. En accord avec ces résultats, le MK-801 administré

avant l'étape de pré-exposition dans la procédure de DCI, perturbe également la formation de la représentation du contexte. Finalement, l'administration conjointe de doses infra-efficaces de Ro64-6198 (0,5 mg/kg) et de MK-801 (0,05 mg/kg), avant le conditionnement classique, ou avant l'étape de pré-exposition dans la procédure de DCI révèle un effet synergique de ces deux composés sur le développement de la peur conditionnée contextuelle. L'ensemble de ces données montrent que l'activation des récepteurs NOP induit préférentiellement des déficits de peur conditionnée contextuelle au même titre que le blocage du RNMDA et suggère en outre qu'il module la formation de la peur conditionnée contextuelle en s'opposant au système glutamatergique.

1.2. Publication

Signalement bibliographique ajouté par le :

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de la Documentation

Activation of nociceptin opioid peptide (NOP) receptor impairs contextual fear learning in mice through glutamatergic mechanisms

Celia GOELDNER, Davids REISS, Jürgen WICHMANN, Brigitte L. KIEFFER and Abdel-Mouttalib OUAGAZZAL

Neurobiology of learning and memory, 2009, vol. 91, n° 4, pages 393-401

Pages 61-69 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2008.12.001>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

1.3. Discussion

Influence des RNOP sur l'acquisition de la peur conditionnée

Le conditionnement de peur est un paradigme simple à l'interface entre processus mnésiques et émotionnels, largement utilisé pour étudier les mécanismes associatifs qui sous-tendent l'apprentissage de la peur conditionnée. L'immobilité (*freezing*), expression comportementale de la peur chez la souris, s'exprime en réponse au stimulus conditionnel sonore (SC) prédictif du choc électrique, ou au contexte de conditionnement. Elle traduit la formation d'une mémoire émotionnelle aversive élémentaire et contextuelle respectivement, lors du conditionnement. Ces deux composantes de la mémoire émotionnelle aversive ont été évaluées séparément : en réexposant les souris après un délai de 24 h, au SC seul dans un contexte modifié, ou au contexte de conditionnement sans présentation du SC. L'immobilité observée immédiatement après le deuxième choc lors du conditionnement, reflèterait une peur contextuelle apprise à court terme, en l'absence de SC (Chang et al., 2008; Fanselow, 2000) et non une peur généralisée suite à l'application du choc électrique. Nos données corroborent cette idée, car les souris recevant un choc immédiatement après introduction dans le contexte n'expriment pas de réponses de peur dans nos conditions, un phénomène décrit comme le déficit de choc immédiat (DCI).

L'activation des récepteurs NOP par le Ro64-6198 avant le conditionnement perturbe l'acquisition de la peur conditionnée contextuelle à court terme et à long terme, mais n'affecte pas le développement de la peur conditionnée élémentaire. Notre équipe a précédemment montré que le Ro64-6198 diminue la sensibilité au choc électrique, mais de manière moins efficace que la morphine (Reiss et al., 2008), analgésique de référence. Afin de vérifier que les effets amnésiques du Ro64-6198 ne sont pas liés aux propriétés analgésiques de ce composé, nous avons comparé les effets du Ro64-6198 à ceux de la morphine. Les données obtenues ici indiquent que les animaux possèdent des facultés d'apprentissage associatif préservées sous l'influence de la morphine. En effet, l'administration d'une dose analgésique de morphine (4 mg/kg) ne prévient ni la formation de la mémoire émotionnelle contextuelle à court terme, ni la formation de la mémoire émotionnelle élémentaire. Elle induit néanmoins des déficits de peur contextuelle à long terme, mais cet effet est aboli lorsque la morphine est réadministrée avant la phase de rappel (réexposition au contexte), et semble ainsi être secondaire à un apprentissage lié à l'état interne produit par cette drogue (Zarrindast et al.,

2006). La persistance des effets amnésiques du Ro64-6198 suite à une injection avant le conditionnement *et* le rappel indique que contrairement à la morphine, les déficits observés ne sont pas secondaires à un apprentissage dépendant de l'état interne, comme cela a été précédemment montré pour la N/OFQ (Fornari et al., 2008). Ces données montrent ainsi une action différentielle du Ro64-6198 et de la morphine sur la formation de la mémoire émotionnelle aversive et suggèrent une dissociation entre les effets analgésiques et amnésiques du Ro64-6198.

Par ailleurs, les déficits de peur contextuelle induits par le Ro64-6198 pourraient également refléter une action anxiolytique de ce composé (Jenck et al., 2000; Varty et al., 2005), capable de diminuer le caractère aversif anxiogène du conditionnement. À court terme, la peur conditionnée contextuelle est évaluée sous l'influence du Ro64-6198 et nous ne pouvons exclure une action directe de ce composé sur l'expression de la réponse d'immobilité. En effet, le Ro64-6198 pourrait agir ici sur les structures effectrices des réponses comportementales de défense et de peur, riches en récepteurs NOP (Florin et al., 2000), comme la substance grise périaqueducale (Kiyuhou and Gemba, 1999) et l'hypothalamus, pour diminuer l'expression du comportement d'immobilité. Cependant, dans nos conditions expérimentales (données non présentées), la dose amnésique de Ro64-6198 n'influence pas les comportements anxieux évalués dans un labyrinthe en croix surélevé. De plus, plusieurs études rapportent que l'injection i.c.v. de N/OFQ immédiatement après le conditionnement perturbe également les réponses de peur conditionnée contextuelle, indiquant que ce peptide agit sur les processus de consolidation mnésique (Mamiya et al., 2003; Roozendaal et al., 2007). Nous suggérons ainsi que les déficits de peur conditionnée, observés suite à l'activation des RNOP par le Ro64-6198, reflèteraient essentiellement une perturbation des capacités mnésiques (cf. plus loin).

RNOP et peur conditionnée contextuelle

L'effet différentiel du Ro64-6198 sur l'acquisition de la peur conditionnée élémentaire et contextuelle suggère une influence préférentielle du système nociceptinergique sur la formation de la mémoire contextuelle aversive. Ces données sont concordantes avec celles de la littérature, qui rapportent que l'administration i.c.v. de N/OFQ perturbe le développement de la peur conditionnée contextuelle dans les paradigmes de peur conditionnée ou d'évitement passif (Mamiya et al., 1999; Mamiya et al., 2003; Nabeshima et al., 1999). De plus, il a été

récemment montré que l'administration i.c.v. de fortes doses de N/OFQ (5 nmole) perturbe à la fois l'acquisition de la peur contextuelle et élémentaire, alors que des doses plus faibles (1 et 2,5 nmole) perturbent exclusivement le développement de la peur contextuelle (Fornari et al., 2008). Cet effet dose-dépendant suggère que la formation de la mémoire associative contextuelle est plus sensible à l'activation du RNOP que la mémoire associative élémentaire. De ce fait, nous ne pouvons exclure qu'une dose plus importante de Ro64-6198 puisse également perturber l'acquisition de la peur conditionnée discrète dans nos conditions. Malheureusement, nous sommes limités par les effets adverses de ce composé à fortes doses chez la souris, qui perturbe l'activité locomotrice (cf. figure 13A). La tâche contextuelle s'avère ainsi plus facile à perturber, ce qui pourrait être attribué à une différence de complexité entre les processus d'acquisition de la peur conditionnée discrète ou contextuelle. En effet, l'association d'un stimulus phasique, saillant et unisensoriel (sonore) nécessite un traitement de l'information moins complexe que les stimuli contextuels multisensoriels présentés en arrière plan (Kim and Fanselow, 1992). Ainsi la formation de la mémoire émotionnelle contextuelle fait appel à des processus mnésiques plus complexes qui nécessitent une coopération entre fonctions hippocampique et amygdalienne, alors que la formation de la mémoire émotionnelle élémentaire dépendrait de processus associatifs simples, sous-tendus essentiellement par l'amygdale (Fanselow and Poulos, 2005; Huff and Rudy, 2004; LeDoux, 2003). Toutefois, la ségrégation entre fonctions hippocampique et amygdalienne reste aujourd'hui discutable, et plusieurs études récentes suggèrent que l'hippocampe participe également à la consolidation de l'association récente entre contexte et choc (Chang et al., 2008; Trifilieff et al., 2007). Nous n'excluons pas l'éventualité d'une contribution des récepteurs NOP de l'amygdale aux déficits de conditionnement. En effet, les RNOP et la N/OFQ sont fortement exprimés dans les différents noyaux du complexe amygdalien et l'injection de N/OFQ dans le noyau basolatéral de l'amygdale suffit à perturber l'acquisition d'une tâche d'évitement passif d'un compartiment précédemment associé à un événement aversif. De plus, l'UFP-101 a un effet facilitateur dans cette tâche (Roosendaal et al., 2007), suggérant une action inhibitrice du système nociceptinergique amygdalien endogène sur la diminution de la formation de la mémoire contextuelle aversive. Toutefois, la peur conditionnée discrète préservée dans notre étude témoigne de processus associatifs fonctionnels au niveau l'amygdale basolatérale, et suggère ici une action majoritairement hippocampique du Ro64-6198 aux doses efficaces.

La théorie de la représentation conjonctive du contexte propose que la fonction de l'hippocampe dans la tâche contextuelle consiste à élaborer une représentation unique et intégrée du contexte à partir de ses différents éléments (Rudy et al., 2004; Rudy and O'Reilly, 2001). Ces éléments seraient représentés au sein d'autres structures dont le cortex enthorinal et périrhinal, et combinés en une représentation intégrée au sein de l'hippocampe pour être ensuite associée au SI, au niveau de l'amygdale (Rudy et al., 2004). La consolidation de la mémoire contextuelle dépendrait ainsi d'une étroite coopération entre l'hippocampe et les structures corticales associées. Ainsi, l'activation des récepteurs NOP par voie systémique pourrait ici altérer la formation de la mémoire contextuelle en perturbant le traitement hippocampique et cortical de l'information.

La procédure de déficit de choc immédiat (DCI) permet la dissociation temporelle des différentes composantes du conditionnement contextuel et constitue de ce fait une procédure de choix pour étudier les effets du Ro64-6198 sur la formation de la mémoire contextuelle, en s'affranchissant d'un éventuel biais lié aux effets de ce composé sur la perception nociceptive ou aversive du choc électrique. Elle permet de mettre en évidence des processus séquentiels distincts au cours du conditionnement contextuel: la formation d'une représentation intégrée du contexte qui peut être stockée et rappelée ultérieurement, puis l'association de cette représentation contextuelle latente au choc électrique. Le déficit d'acquisition de la peur conditionnée contextuelle est révélé en l'absence d'une durée d'exploration suffisante du contexte de conditionnement (Fanselow, 2000; Frankland et al., 2004). Il peut ensuite être rétabli grâce à une pré-exposition à ce contexte (Fanselow, 2000; Frankland et al., 2004). Il est intéressant de noter que la présentation visuelle d'un contexte, sans exploration active de celui-ci (McHugh and Tonegawa, 2007), ne permet pas le rétablissement de la peur conditionnée contextuelle. De façon similaire, la pré-exposition aux seuls éléments individuels constituant ce contexte (Rudy and O'Reilly, 1999) ne suffit pas à contrecarrer le DCI, suggérant qu'une représentation conjonctive de l'ensemble des éléments du contexte est nécessaire pour permettre son association subséquente au choc lors du conditionnement. En effet, nos données montrent une facilitation des processus d'acquisition de la peur conditionnée contextuelle proportionnelle au temps d'exploration. L'hippocampe a été robustement impliqué dans l'acquisition (Hunsaker and Kesner, 2008; Matus-Amat et al., 2004) et la consolidation (Biedenkapp and Rudy, 2004; Chang et al., 2008) de la représentation contextuelle. Par contre, le rôle de la fonction hippocampique pour le stockage

à long terme des informations contextuelles est plus controversé et serait limité dans le temps (Frankland and Bontempi, 2005; Wiltgen and Silva, 2007). Ces représentations seraient stockées et réactivées au sein d'autres structures, néocorticales surtout, lors du rappel à long terme (1 mois) (Anagnostaras et al., 1999; Wiltgen et al., 2004). Toutefois, il semble toujours engagé dans la réactivation de la représentation du contexte dans notre condition, lorsque le rappel a lieu après un délai de 24 heures (Matus-Amat et al., 2004; Quinn et al., 2008). L'activation des RNOP avant l'étape de pré-exposition au contexte empêche l'acquisition de la peur conditionnée contextuelle. En accord avec l'implication du système nociceptinergique hippocampique dans les processus de mémoire spatiale (Sandin et al., 1997; Sandin et al., 2004; Taverna et al., 2005), nos données indiquent que le Ro64-6198 interfère essentiellement avec le traitement hippocampique de l'information permettant la formation d'une représentation contextuelle.

Interaction entre récepteurs NOP et NMDA lors de la formation de la mémoire contextuelle

Le récepteur au glutamate de type NMDA (RNMDA) est un élément déterminant pour la formation de la mémoire spatiale et contextuelle, et l'antagonisme de ce récepteur au niveau de l'hippocampe empêche la réalisation de ces tâches (Bast et al., 2003; Stiedl et al., 2000). Nos données confirment une contribution importante de ce récepteur aux processus d'acquisition de la peur conditionnée contextuelle (Bardgett et al., 2003; Gould et al., 2002) suite à l'antagonisme des RNMDA avec un antagoniste non compétitif, le MK-801. Plusieurs études indiquent également que ce récepteur est aussi impliqué dans la formation de la représentation d'un contexte (Cravens et al., 2006; Roesler et al., 2005; Stote and Fanselow, 2004). Nous avons ainsi postulé que les déficits de mémoire émotionnelle aversive consécutifs à l'activation des RNOP pourraient refléter une perturbation de la fonction glutamatergique mise en jeu lors de la formation de la mémoire contextuelle. En effet, l'administration conjointe de doses infra-efficaces de Ro64-6198 (0,5 mg/kg) et de MK-801 (0,05 mg/kg) avant le conditionnement classique, ou avant l'étape de pré-exposition dans la procédure de DCI, révèle un effet synergique de ces deux composés sur le développement de la peur conditionnée contextuelle. Ceci suggère que le système nociceptinergique s'oppose à l'action glutamatergique facilitatrice nécessaire à la réalisation de tâches mnésiques dépendantes des fonctions hippocampiques.

Conclusion

Cette étude a permis de confirmer l'influence inhibitrice du système nociceptinergique sur les processus d'acquisition de la peur conditionnée, en particulier sa composante contextuelle. Les RNOP exercent une influence inhibitrice sur les processus mnésiques engagés dans la formation de la représentation du contexte, en s'opposant à l'action facilitatrice des récepteurs NMDA. Il est ainsi envisageable que les déficits mnésiques induits par l'activation du RNOP puisse résulter d'une inhibition de l'activité glutamatergique nécessaire à l'initiation des phénomènes de plasticité au sein de l'hippocampe, siège principal de la formation de la mémoire à long terme.

2. « L'activation du récepteur NOP perturbe la mémoire de reconnaissance en inhibant la signalisation ERK/MAPK qui dépend du récepteur NMDA dans l'hippocampe. »

2.1. Résumé en français

Cette étude aborde pour la première fois la contribution du système nociceptinergique aux processus mnésiques qui sous-tendent la mémoire de reconnaissance et cherche à en identifier les mécanismes moléculaires et les substrats neurobiologiques. Nous étudions l'influence inhibitrice du récepteur NOP suite à son activation par la N/OFQ ou l'agoniste synthétique Ro64-6198, sur les performances mnésiques dans une tâche de reconnaissance d'objet chez la souris. Puis nous cherchons à mettre en évidence une contribution glutamatergique à ces effets, par le biais du récepteur NMDA. En parallèle, nous évaluons les effets de l'activation du récepteur NOP sur la voie de signalisation des MAPK hippocampiques située en aval du récepteur NMDA. Le paradigme de reconnaissance d'objet se déroule en trois étapes, distantes de 24 heures: une étape d'habituation à l'arène, une étape de familiarisation avec un premier objet (acquisition), puis une étape de rappel permettant d'évaluer les capacités de discrimination entre objets nouveau et familier. L'injection par voie intracérébro-ventriculaire de N/OFQ (1 nmole, i.c.v.) ou de Ro64-6198 par voie périphérique (0,3 et 1 mg/kg) avant l'étape d'acquisition perturbe les capacités de discrimination 24 heures plus tard. L'injection bilatérale de N/OFQ dans le parenchyme hippocampique (3 nmole/coté) mime ces effets, alors que l'injection d'un antagoniste des récepteurs NOP, l'UFP-101 (5 nmole/coté) contrecarre les déficits induits par l'administration systémique de Ro64-6198. Ces données désignent l'hippocampe dorsal en tant que site d'action des effets amnésiants observés. Afin de préciser les cibles moléculaires du RNOP potentiellement impliquées, nous avons étudié les effets du Ro64-6198 sur la voie de signalisation des MAPK (*mitogen activated protein kinase*) ERK (*extracellular regulated kinase*) et JNK (*c-jun N-terminal kinase*) au niveau de l'hippocampe. L'exploration de l'objet lors de l'étape d'acquisition induit une activation robuste de ERK2, mais non de JNK1/2, révélée par immunoblot sur homogénats d'hippocampe. L'inhibition de la MAPKkinase MEK1/2 (SL-327, 50 mg/kg) bloque l'augmentation de phosphorylation de ERK2 suite à l'exploration de l'objet et perturbe la formation de la mémoire de reconnaissance à long terme. Ceci confirme le recrutement de la signalisation ERK pour la formation de la trace mnésique dans cette tâche.

L'activation des RNOP (Ro64-6198, 1 mg/kg) et le blocage du RNMDA (MK-801, 0,1 mg/kg) induit les déficits mnésiques ainsi qu'une limitation de l'activation de ERK2 consécutive à l'exploration de l'objet. De manière intéressante, seul le MK-801 (0,3 mg/kg) diminue la phosphorylation de ERK et JNK en condition basale dans l'hippocampe, suggérant que le RNMDA active ces voies de signalisation de manière constitutive. Enfin, l'administration combinée de doses infra efficaces de Ro64-6198 (0,3 mg/kg) et de MK-801 (0,01 mg/kg) révèle une synergie d'action de ces composés, qui réduit à la fois la formation de la mémoire de reconnaissance à long terme et l'activation de ERK2 au niveau de l'hippocampe. Ces données suggèrent un antagonisme fonctionnel entre RNOP et RNMDA tant au niveau cellulaire, qu'au niveau comportemental. Nous concluons que le système nociceptinergique perturbe la mémoire de reconnaissance en interférant avec les processus de consolidation à long terme engageant la voie de signalisation ERK de l'hippocampe, qui est sous contrôle du RNMDA.

2.2. Publication

Nociceptin Receptor Impairs Recognition Memory via Interaction with NMDA Receptor-Dependent Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular Signal-Regulated Kinase Signaling in the Hippocampus

Celia Goeldner,¹ David Reiss,¹ Jürgen Wichmann,³ Hamid Meziane,² Brigitte L. Kieffer,¹ and Abdel-Mouttalib Ouagazzal¹

¹Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire and ²Institut Clinique de La Souris, 67404 Illkirch, France, and ³Pharmaceuticals Division, Discovery Chemistry, F. Hoffmann-La Roche, CH-4070 Basel, Switzerland

Strong evidence suggests a role for nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ) neuropeptide and its receptor (NOP) in cognition. However, the signaling mechanisms underlying N/OFQ modulation of memory are less understood. Here, we show that intracerebroventricular or intrahippocampal infusions of N/OFQ impair long-term memory formation in the mouse object recognition task. The synthetic NOP receptor agonist, (1*S*,3*aS*)-8-(2,3,3*a*,4,5,6-hexahydro-1*H*-phenalen-1-yl)-1-phenyl-1,3,8-triaza-spiro[4.5]decan-4-one (Ro64-6198), administered systemically, also produced amnesic effects that were blocked by coinfusion of the NOP receptor antagonist, [Nphe1,Arg14,Lys15]nociceptin-NH₂ (UFP-101), into the dorsal hippocampus. In contrast, Ro64-6198 had no effect on short-term memory or recall performances. Immunoblotting analysis revealed a strong suppressive action of Ro64-6198 on learning-induced upregulation of hippocampal extracellular signal-regulated kinase (ERK) phosphorylation, which is crucial for long-term information storage. Accordingly, pharmacological inhibition of ERK activation after systemic injection of SL327 [α -[amino[(4-aminophenyl)-thio]methylene]-2-(trifluoromethyl)benzene acetonitrile], a selective inhibitor of the upstream kinase MEK (mitogen-activated protein kinase kinase), abolished long-term recognition memory formation. The noncompetitive NMDA receptor antagonist (+)-5-methyl-10,11-dihydro-5*H*-dibenzo [a,d]cyclohepten-5,10-imine maleate (MK-801), given systemically, also suppressed ERK activation and disrupted recognition memory. In contrast, no effect of MK-801 was observed on recall, as for Ro64-6198. When administered concurrently at subthreshold doses, Ro64-6198 and MK-801 synergistically suppressed hippocampal ERK activation and impaired long-term memory formation. Under resting conditions, neither Ro64-6198 nor MK-801 affected spontaneous ERK activity in the hippocampus at the amnesic doses whereas at higher doses, only MK-801 had a suppressive effect. We conclude that N/OFQ-NOP receptor system negatively regulates long-term recognition memory formation through hippocampal ERK signaling mechanisms. This modulation may in part take place by inhibiting glutamatergic function at the NMDA receptor.

Key words: opioid; NOP receptor; NMDA receptor; hippocampus; recognition memory; ERK; mice

Introduction

Nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ) is an opioid-like neuropeptide that selectively binds to the NOP receptor (formerly orphan opioid receptor-like-1) (Meunier et al., 1995; Reinscheid et al., 1995). Since its discovery a decade ago, this neuropeptide-receptor system has been implicated in a host of biological functions (Chiou et al., 2007). One of the most established findings is

the importance of this system in cognition. N/OFQ and its receptor are densely expressed in brain regions associated with learning and memory processes, such as the hippocampus, the amygdala, and the cerebral cortex (Darland and Grandy, 1998; Neal et al., 1999a,b). Furthermore, NOP receptor activation with N/OFQ or synthetic agonists impairs memory performances in a variety of cognitive tasks in rodents (Sandin et al., 1997; Hiramatsu and Inoue, 1999; Redrobe et al., 2000; Higgins et al., 2002; Mamiya et al., 2003; Liu et al., 2007; Roozendaal et al., 2007), whereas the deletion of *NOP receptor* or *preproN/OFQ* gene produces the opposite effects (Manabe et al., 1998; Higgins et al., 2002; Mamiya et al., 2003). Consistent with these findings, electrophysiological studies showed that N/OFQ potently inhibits synaptic transmission and synaptic plasticity in the hippocampus and the amygdala (Yu et al., 1997; Meis and Pape, 1998; Yu and Xie, 1998; Wei and Xie, 1999; Bongsebandhu-phubhakdi and Manabe, 2007).

Received Aug. 15, 2007; revised Jan. 15, 2008; accepted Jan. 15, 2008.

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Université Louis Pasteur de Strasbourg, and National Institute of Drug Abuse Grant DA05010. C. Goeldner was supported by a grant from the French Government (Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur).

Correspondence should be addressed to Dr. Abdel-Mouttalib Ouagazzal, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 1 Rue Laurent Fries, BP 10142, 67404 Illkirch, France. E-mail address: Abdel-Mouttalib.OUAGAZZAL@igbmc.u-strasbg.fr.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.3711-07.2008

Copyright © 2008 Society for Neuroscience 0270-6474/08/282190-09\$15.00/0

Despite these advances, the signaling mechanisms underlying NOP receptor modulation of memory remain largely unknown. Memory formation depends on activation of intracellular signaling pathways and gene expression required for synaptic plasticity and long-term storage of information. Recently, there has been considerable interest in the role of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in cognition as they are an essential component of the transduction mechanisms leading to transcriptional activity in neurons (Sweatt, 2004; Davis and Laroche, 2006; Giovannini, 2006). The extracellular signal-regulated kinase (ERK) MAPK plays a pivotal role in synaptic plasticity and several forms of hippocampus-dependent memories (Sweatt, 2004; Davis and Laroche, 2006; Giovannini, 2006). After activation, ERK can translocate to the nucleus and target transcription factors, such as CREB (cAMP response element-binding protein) and Elk (Sweatt, 2001; Davis et al., 2006; Giovannini, 2006), which, in turn, trigger memory-associated gene expression. Many neurotransmitter receptors which facilitate memory formation and promote synaptic plasticity, including the glutamatergic NMDA receptor, positively regulate ERK activity in hippocampal neurons (Poser and Storm, 2001; Sweatt, 2004). NOP receptor was also shown to activate this signaling pathway in transfected cell lines (Fukuda et al., 1997; New and Wong, 2002); however, no information is available with regard to its action in brain neurons. Based on behavioral and electrophysiological studies, we hypothesized that NOP receptor would rather inhibit ERK activity in hippocampal neurons during learning. In this study, we provide evidence for this hypothesis using a mouse object recognition task. We show that NOP receptor activation impairs long-term recognition memory formation by inhibiting NMDA receptor-mediated ERK activation in the hippocampus. However, NOP receptor does not seem to modulate hippocampal ERK activity under resting conditions, unlike the NMDA receptor which constitutively activates this signaling pathway.

Materials and Methods

Animals. Eight-week-old C57BL/6N male mice were purchased from Charles River Laboratory (St-Germain-sur-l'Arbresle, France), and housed four per cage in individually ventilated cages (M.I.C.E. cages; Charles River Laboratory) with water and food *ad libitum*. Mice were maintained on a 12 h light/dark cycle (light on at 7:00 A.M., off at 7:00 P.M.) and were allowed 4–6 weeks of acclimatization before surgery or testing. Behavioral testing was performed during the light cycle between 9:00 A.M. and 5:00 P.M. All experimental procedures were performed on naive mice and according to the European Union guidelines.

Surgery and infusion procedure. Mice were anesthetized with a mixture of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) and placed in a stereotaxic frame (Unimécanique, Epinay-sur-Seine, France). The skull was exposed and the incisor bar adjusted such that bregma and λ were at the same height. An 8-mm-long stainless-steel guide cannula (0.4 mm external diameter; Cortat, Courrendlin, Switzerland), was positioned 1 mm over the lateral ventricle [coordinates: antero-posterior (AP), -0.16 mm; lateral (L), $+1$ mm from the bregma; dorsoventral (DV), -2 mm from the skull surface] according to the atlas of Paxinos and Watson (2001). For hippocampal implantation, 8 mm long stainless-steel guide cannulas (0.4 mm external diameter) were positioned bilaterally 1 mm over the dorsal hippocampus (coordinates: AP, -2 mm; L, ± 1.6 mm from the bregma; DV, -1.2 mm from the skull surface). To control for anatomical specificity, a group of mice was implanted bilaterally in an area adjacent to the hippocampus. The injection sites were positioned into the somatosensory cortex above the hippocampus (coordinates: AP, -1.8 mm; L, ± 3.0 mm

from the bregma; DV, -0.3 mm from the skull surface). The cannulas were fixed to the skull with anchoring screws and dental cement. Wire stylets were inserted into the cannulas to prevent occlusion. After surgery, mice were housed two per cage and allowed to recover at least 1 week before behavioral testing. During this period, stylets were replaced to keep the cannulas patent and custom the animals to handling. Intracerebral infusions were performed with stainless-steel injector needles (0.28 mm external diameter) that protruded the cannula by 1 mm, into the lateral ventricle, the dorsal hippocampus, or the cortex. Intracerebroventricular injections were made in a volume of 2 μ l at rate of 1 μ l/min via Hamilton syringe mounted on a micro-drive pump (Harvard Apparatus, Les Ulis, France). Intrahippocampal infusions were made in a volume of 0.25 μ l/site at rate of 0.125 μ l/min. This injection volume was selected based on previous studies (Daumas et al., 2005; Fischer et al., 2007).

Object recognition task and experimental design. Testing was performed in dimly lit (50 lux) open-field arenas ($44 \times 44 \times 17$ cm³; Panlab, Barcelona, Spain) fitted with infrared beam frames, which provide automated measures of locomotor activity (Actitrack, Barcelona, Spain). The general procedure consisted of three different phases carried over 3 consecutive days (Dodart et al., 1997). On the first day, mice were habituated to the experimental conditions and open-field arena for 30 min. The following day, they were submitted to a 10 min familiarization trial in the presence of an object A (dice or marble) placed in the northeast or northwest corner of the open-field arena. The presentation of the objects (dice or marble) as well as their position (northeast or northwest) was counterbalanced between mice for each treatment. The time spent exploring the object (T_1A), defined as head oriented within 1–2 cm and toward the object, was hand-scored with a stopwatch. Minimum exploration time was set to 3 s, and mice that did not reach this criterion were excluded from the study. On the third day, mice were submitted to a 10 min choice trial in the presence of the familiar object (A) placed in the same corner, and a novel object (B) placed in the opposite corner. The time spent exploring the two objects (T_2A and T_2B , respectively) was manually scored for 10 min. After each run, arenas and objects were cleaned. The experimenter scoring mouse behavior was blind to drug treatment. The discrimination index (DI) was defined as $(T_2B/(T_2A + T_2B) \times 100)$. A DI of 50% corresponds to chance level and a significantly higher DI reflects good recognition memory.

Drugs and injections. The N/O/FQ peptide and the peptidic NOP receptor antagonist [Nphe1,Arg14,Lys15]nociceptin-NH2 (UFP-101) were synthesized in house (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire peptide synthesis platform) and were dissolved in artificial CSF containing (in mM) 126.6 NaCl, 27.4 NaHCO₃, 2.4 KCl, 0.5 KH₂PO₄, 0.89 CaCl₂, 0.8 MgCl₂, 0.48 Na₂HPO₄, and 7.1 glucose, pH 7.4. Intracerebroventricular and intrahippocampal injections took place 5 and 2 min before the familiarization trial, respectively. Control groups received corresponding volume of CSF. (1S,3aS)-8-(2,3,3a,4,5,6-hexahydro-1H-phenalen-1-yl)-1-phenyl-1,3,8-triaza-spiro[4.5]decan-4-one (Ro64-6198) (a generous gift from Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland), an NOP receptor agonist, was dissolved in saline (0.9% NaCl) containing 0.3% Tween 20 and injected intraperitoneally at a volume of 10 ml/kg, with 30 min pretreatment time. (+)-5-Methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine maleate (MK-801; Sigma, St Quentin Fallavier, France), a noncompetitive NMDA receptor antagonist, was dissolved in saline (0.9% NaCl) and injected subcutaneously at a volume of 10 ml/kg, with 30 min pretreatment time. α -[Amino(4-aminophenyl)thio]methylene]-2-(trifluoromethyl)benzene acetonitrile (SL327) (Sigma) MAPK kinase (MEK)/ERK inhibitor, was dissolved in DMSO and injected intraperitoneally at a volume of 2 ml/kg, with 1 h pretreatment time, based on previously described procedures (Atkins et al., 1998; Selcher et al., 1999).

Hippocampal MAPK analysis. The phosphorylated state of ERK and c-Jun N-terminal protein kinase (JNK) in the hippocampus was detected by Western blotting. For the time course study, mice were habituated 30 min to the open field arena. The following day, the mice were killed, either immediately after (0 min condition) or 30 min after a 10 min exposure to an object (familiarization trial). Mice presented

to an empty open field arena served as controls. For drug studies, mice were killed 30 min after the familiarization trial, and vehicle-treated mice served as controls. Immediately after decapitation, the hippocampus was rapidly dissected and kept at -80°C . Frozen hippocampi were then homogenized and sonicated in 2% SDS buffer containing (in mM) 50 Tris, pH 6.8, 1 EDTA, 1 sodium fluoride, and 1 sodium orthovanadate, as well as a complete protease inhibitor mixture (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). Homogenates were boiled at 96° for 4 min, and total protein content was determined by Bradford assay. Twenty micrograms of protein were loaded on a SDS-10% bisacrylamide gel and separated by constant voltage of 100 V for 1 h, then transferred to polyvinylidene difluoride membranes at a constant voltage of 100 V for 1 h in cold transfer buffer (Tris-borate). Membranes were blocked in 5% nonfat dry milk in a Tris-buffered saline (TBS) solution containing 0.1% v/v Tween 20, for 1 h. Activated MAPK were recognized with primary anti-phospho-MAPK antibodies [anti-phospho-p44/42 MAPK/ERK (Thr202/Tyr204) monoclonal antibody, 1:4000, or anti-phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) rabbit mAb, 1:1000; Cell Signaling Technology, Beverly, MA] diluted in blocking solution and incubated overnight at 4°C . Membranes were washed three times for 5 min in TBS solution and incubated for 1 h at room temperature in horseradish peroxidase conjugated anti-mouse or anti-rabbit IgG secondary antibodies (1:20,000; GE Healthcare, Saclay, France). The signal was revealed using enhanced chemiluminescent reagents (ECL+; GE Healthcare) and directly quantified using a CDD camera (Chemigenius² apparatus; SynGene, Dorset, UK) allowing image capture (GeneSnap software; SynGene) and direct blot analysis (GeneTools software; SynGene). To analyze the total MAPK content of samples, membranes were then stripped of antibodies for 20 min (Re-blot plus solution; Millipore, St. Quentin, France), rinsed, and blocked at room temperature for 1 h. Blots were reincubated with total MAPK primary antibody (anti-p44/42 MAPK/ERK, 1:2000, or anti-SAPK, 1:1000; Cell Signaling Technology) at 4°C overnight, then washed three times for 5 min and incubated for 1 h at room temperature in horseradish-peroxidase conjugated anti-rabbit IgG secondary antibodies (1:20,000; GE Healthcare) before being reacted with ECL+ solution. The amount of activated MAPK was determined by normalizing the ratio of phosphorylated forms of MAPK to corresponding total MAPK on the same blot, and expressed in terms of percentage of variation to the control. Only changes of phosphorylated ERK2 (pERK2) were reported because the signal of pERK1 was often below detection threshold in our experimental conditions.

Histology. Mice were killed by decapitation, and whole brains were removed and slowly frozen in cooled isopentane (-40°). Coronal sections were cut in a cryostat (Leica, Rueil-Malmaison, France) maintained at approximately -18°C . Twenty micrometer brain sections were mounted on coated slides, and stained with 0.5% cresyl violet acetate. The sections were examined under a light microscope (Leica Macroscope M420) and the location of injection needle tips was determined according to the standardized atlas plates of Paxinos and Watson (2001). Mice with injection needle placements outside of the boundaries of targeted areas were excluded from behavioral analysis. For the dorsal hippocampus, $\sim 15\%$ of mice in each experiment showed cannula misplacement and were excluded from behavioral analysis. For somatosensory cortex, the percentage of excluded mice was $\sim 20\%$ (data not shown).

Statistics. Data were analyzed by one-way or two-way ANOVA with the drug treatment as main factor or using unpaired Student's *t* test for single-dose drug treatments (MK-801, SL327). When relevant, Student-Neuman-Keuls *post hoc* test was conducted for individual comparisons. One group Student's *t* tests were used to compare discrimination index values to the chance level (50%). For all comparisons the significance criterion was $p < 0.05$.

Results

N/OFQ inhibits formation of long-term recognition memory

We first studied the effects of intracerebroventricular infusions of N/OFQ peptide (0.1, 0.3, and 1 nmol; $n = 6-7$ per dose) on

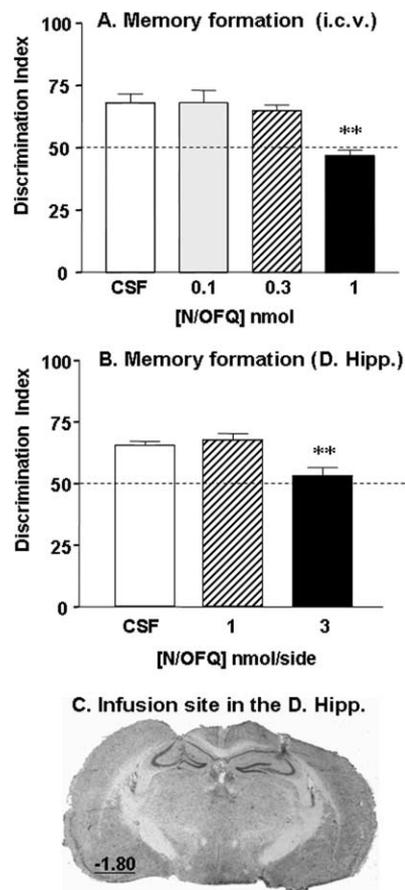


Figure 1. N/OFQ peptide impairs long-term recognition memory formation. **A**, Deficits in object discrimination induced by intracerebroventricular injections of N/OFQ (0.1, 0.3, and 1 nmol; $n = 6-7$ per dose). **B**, Deficits in object discrimination induced by bilateral N/OFQ infusions into the dorsal hippocampus (D. Hipp.; 1 and 3 nmol/side; $n = 7-9$ per dose). In both experiments, N/OFQ was administered before the familiarization trial and memory performance was assessed drug-free 24 h later during the choice trial. Data are presented as mean discrimination index \pm SEM. The dashed line materializes the chance level of 50% indicating equal exploration of both objects. **C**, Representative coronal section of the cannula placement in the dorsal hippocampus after cresyl violet acetate staining. The value indicates the distance in mm posterior to the bregma, according to the atlas of Paxinos and Watson (2001). *** $p < 0.01$, significantly different from CSF-treated group.

long-term recognition memory. During the familiarization phase, CSF- and N/OFQ-treated mice displayed comparable exploration time of the object [$F_{(3,22)} = 1.4$, not significant (n.s.)] (supplemental Table 1, available at www.jneurosci.org as supplemental material) and locomotor activity ($F_{(3,22)} = 1.8$, n.s.) (supplemental Table 1, available at www.jneurosci.org as supplemental material), indicating that the peptide did not affect locomotor function. In the subsequent choice trial, CSF-treated mice displayed good long-term memory performances as reflected by the DI significantly above the chance level ($p < 0.05$) (Fig. 1A). In contrast, mice that received N/OFQ injections displayed reduced discrimination performances ($F_{(3,22)} = 8.4$; $p < 0.05$) (Fig. 1A). *Post hoc* comparisons indicated that the 1 nmol dose significantly impaired recognition memory compared with CSF treatment ($p < 0.01$) (Fig. 1A).

To identify the possible sites of action of N/OFQ, we examined the effects of bilateral infusions of the peptide into the dorsal hippocampus (Fig. 1C), a brain region that plays a key role in recognition memory and also highly expresses NOP receptors. Hippocampal infusions of N/OFQ (1 and 3 nmol/

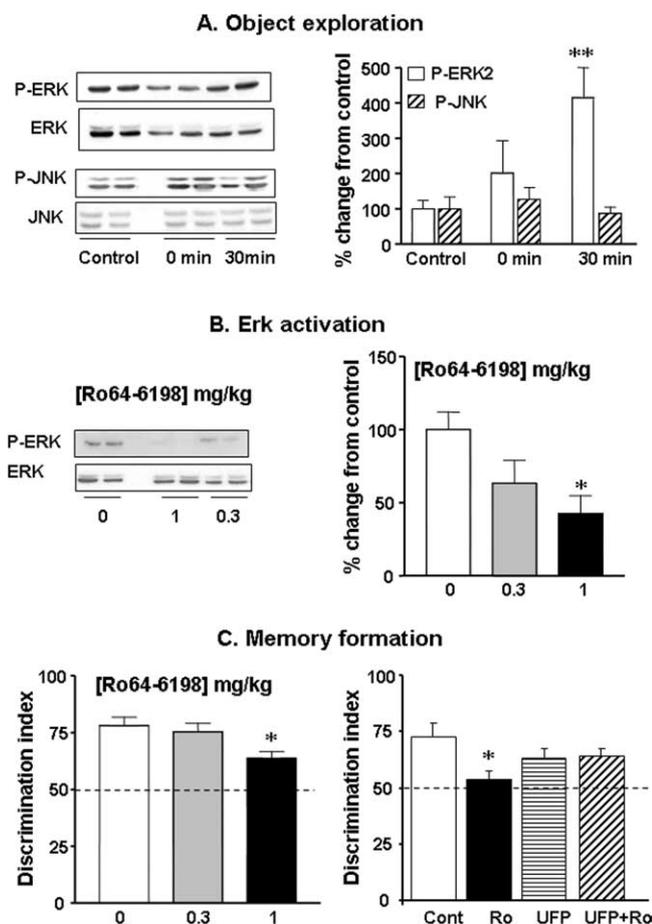


Figure 2. Activation of NOP receptors impairs long-term recognition memory formation through hippocampal ERK-dependent mechanisms. **A**, Hippocampal ERK and JNK phosphorylation after exploration of a novel object. Representative Western blots of phosphorylated and total forms of ERK and JNK in hippocampal samples collected either immediately ($n = 4$) or 30 min ($n = 4$) after object exploration (duplicates). Histograms represent the mean percentage of change from control \pm SEM for pERK2 and pJNK normalized to total ERK2 and JNK for each time point. Control group ($n = 10$) corresponds to samples collected immediately ($n = 5$) or 30 min ($n = 5$) after exposure of mice to an empty open field arena. Data from both control groups were pooled as MAPK levels were comparable. **B**, Ro64-6198 reduces learning-induced hippocampal ERK activation. Western blots represent the phosphorylated and total forms of ERK2 (duplicates), 30 min after the familiarization trial. Histogram represents the mean percentage of change, from the vehicle-treated group \pm SEM, of normalized pERK2 immunoreactivity ($n = 4$ –6 per dose). **C**, Left, Ro64-6198 (0, 0.3, and 1 mg/kg; $n = 9$ –10 per dose) administered before the familiarization trial impairs long-term recognition memory formation. Right, Intra-hippocampal infusion of the NOP receptor antagonist UFP-101 reverses Ro64-6198-induced memory deficits. Ro64-6198 (1 mg/kg) and UFP-101 (5 nmol/site) were administered separately or concurrently ($n = 7$ per treatment) before the familiarization trial. The dashed line materializes chance level of 50%. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, significantly different from vehicle-treated group.

side, $n = 7$ –9 per dose) did not modify the time spent exploring the object ($F_{(2,21)} = 0.1$; n.s.) (supplemental Table 1, available at www.jneurosci.org as supplemental material) nor the total locomotor activity ($F_{(2,21)} = 1.1$; n.s.) (supplemental Table 1, available at www.jneurosci.org as supplemental material) during the familiarization trial. However, it markedly reduced object discrimination in the subsequent choice trial ($F_{(2,21)} = 9.2$; $p < 0.01$) (Fig. 1B), and a significant memory impairment was obtained with 3 nmol of N/OFQ ($p < 0.01$). Because of concerns that an injection volume of 0.25 μ l to the dorsal hippocampus may have spread to adjacent areas, we studied the anatomical specificity of the amnesic effects of

N/OFQ (3 nmol) by infusing it above the hippocampus into the somatosensory cortex. Bilateral infusion of N/OFQ into this area, in the same conditions as hippocampal infusions, had no effect on object exploration during the familiarization trial [T_1A (s), CSF, $n = 6$, 7.5 ± 1.2 ; N/OFQ, $n = 5$, 6.8 ± 2.0 , n.s.] and also failed to affect object discrimination performance during the choice trial (CSF, 66 ± 1 ; N/OFQ, 64 ± 2 , n.s.).

NOP receptor activation inhibits recognition memory via hippocampal ERK signaling mechanisms

To clarify the molecular mechanism of action of N/OFQ-NOP receptor system on hippocampal function, we first investigated the contribution of ERK and JNK signaling cascades in object recognition memory formation. The role of hippocampal ERK cascade in memory processes is now well established (Sweatt, 2001; Giovannini, 2006), but the role of JNK is still unclear. Western immunoblotting analysis revealed a time-dependent upregulation of ERK2 phosphorylation in the hippocampus of mice exposed to an object compared with those exposed to an empty open field arena ($F_{(2,15)} = 7.0$; $p < 0.01$), and a robust ERK activation was detected at the 30 min time point ($p < 0.01$) (Fig. 2A). However, no changes in hippocampal pJNK levels were detected immediately after or 30 min after familiarization with the object ($F_{(2,12)} = 0.5$; n.s.) (Figure 2A), suggesting that this MAPK may not be recruited during the early phase of consolidation like ERK.

We then examined whether pharmacological inhibition of the ERK cascade affected recognition memory formation. Administration of SL327 (50 mg/kg), a specific inhibitor of the upstream kinase MEK, significantly reduced activated ERK2 level in the hippocampus (vehicle, 100 ± 10 ; SL327, 51 ± 6 ; $p < 0.05$; $n = 5$ per treatment). As expected, SL327 also lowered basal hippocampal pERK2 level under resting conditions (vehicle, 100 ± 14 ; SL327, 46 ± 14 ; $p < 0.05$; $n = 4$ per treatment), whereas it left pJNK levels intact (vehicle, 100 ± 9 ; SL327, 87 ± 4 , n.s.; $n = 4$ per treatment), thus confirming the pharmacological selectivity of this inhibitor. In the object recognition task, SL327 (50 mg/kg, $n = 9$) did not affect locomotor activity nor object exploration during the familiarization trial (n.s. for both) (supplemental Table 2, available at www.jneurosci.org as supplemental material). In contrast, it significantly reduced discrimination performances in the subsequent choice trial (vehicle, 67 ± 6 ; SL327, 55 ± 2 ; $n = 8$ and 9, respectively; $p < 0.05$), confirming that ERK cascade activation is required for long-term recognition memory formation.

We next investigated whether NOP receptor activation could affect recognition memory formation through hippocampal ERK-dependent mechanisms. To this end, we used the selective and brain-penetrant NOP receptor agonist, Ro64-6198 (Jenck et al., 2000). Systemic administration of Ro64-6198 (0.3 and 1 mg/kg, $n = 6$ per dose), significantly reduced activated ERK2 level in the hippocampus ($F_{(2,21)} = 4.6$; $p < 0.05$), and a significant effect was detected at the 1 mg/kg dose compared with the vehicle treatment ($p < 0.05$) (Fig. 2B). In the object recognition task, Ro64-6198 (0.3 and 1 mg/kg, $n = 9$ –10 per dose) treatment had no effect on open field locomotor activity during the familiarization trial ($F_{(2,25)} = 1.2$, n.s.) (supplemental Table 2, available at www.jneurosci.org as supplemental material), but significantly enhanced object exploration time at 1 mg/kg ($p < 0.01$) (supplemental Table 2, available at www.jneurosci.org as supplemental material). During the choice trial, Ro64-6198-treated

mice showed reduced object discrimination performances ($F_{(2,25)} = 4.1$; $p < 0.05$) (Fig. 2C), and a significant effect was detected in the 1 mg/kg group ($p < 0.05$). To identify the possible site of action of Ro64-6198, we examined whether the blockade of hippocampal NOP receptors with the selective peptide antagonist UFP-101, could reverse Ro64-6198-induced recognition memory impairment. Ro64-6198 treatment alone (1 mg/kg, $n = 7$) had no effect on locomotor activity (n.s.) (supplemental Table 3, available at www.jneurosci.org as supplemental material), but enhanced object exploration during the familiarization trial. Accordingly, a significant main effect of Ro64-6198 treatment was detected on object exploration time ($F_{(1,22)} = 5.26$; $p < 0.05$) (supplemental Table 3, available at www.jneurosci.org as supplemental material), but *post hoc* analysis failed to reach statistical significance. Intra-hippocampal infusions of UFP-101 alone (5 nmol/side; $n = 7$) had no effect on locomotor activity nor object exploration time (n.s.) (supplemental Table 3, available at www.jneurosci.org as supplemental material). Also, no significant interaction was detected between drugs on both measures ($F_{(1,22)} = 1.17$, n.s.) (supplemental Table 3, available at www.jneurosci.org as supplemental material). In the choice trial, 1 mg/kg Ro64-6198 significantly impaired object discrimination ($F_{(1,22)} = 4.35$; $p < 0.05$) (Fig. 2C). UFP-101 alone had no effect on discrimination performances ($F_{(1,22)} = 0.01$, n.s.), but reversed the memory impairment induced by Ro64-6198 (Ro64-6198 by UFP-101 interaction, $F_{(1,22)} = 5.12$; $p < 0.05$) (Fig. 2C).

Because Ro64-6198 enhanced object exploration, we verified that the memory deficits were not secondary to impaired perception and attention during the familiarization trial. To this end, we studied the effects of Ro64-6198 on recall after 24 h delay. When administered before the choice trial, Ro64-6198 (0.3 and 1 mg/kg; $n = 10$ –11 per dose) had no effect on total locomotor activity ($F_{(2,28)} = 0.2$, n.s.) (supplemental Table 4, available at www.jneurosci.org as supplemental material), but the 1 mg/kg dose significantly enhanced object exploration ($p < 0.05$ for both objects) (supplemental Table 4, available at www.jneurosci.org as supplemental material). Despite this increase in exploration, the overall recognition performances remained intact under Ro64-6198 treatment (vehicle, 71 ± 2 ; 0.3 mg, 77 ± 4 ; 1 mg, 70 ± 5 ; $F_{(2,28)} = 0.9$, n.s.) indicating that the drug did not affect information retrieval processes nor object perception. In a final set of experiments, we assessed the effects of Ro64-6198 on memory using a short retention delay (3 h). Again, no effects of Ro64-6198 were detected on short-term recognition memory ($F_{(2,23)} = 0.6$, n.s.; $n = 8$ –9 per dose) (supplemental Fig. 1A, available at www.jneurosci.org as supplemental material) or recall performances ($F_{(2,33)} = 1.1$, n.s.; $n = 12$ per dose) (supplemental Fig. 1B, available at www.jneurosci.org as supplemental material). These results show that the NOP receptor agonist preferentially impaired mnemonic processes related to long-term consolidation through an action on hippocampal NOP receptors. They also suggest that amnesic effects may be linked to the inhibition of hippocampal ERK activation which is required for long-term recognition memory formation.

NOP and NMDA receptors regulate recognition memory formation via common ERK signaling mechanisms

Electrophysiological studies indicate that N/OFQ inhibits synaptic transmission and plasticity in the hippocampus through suppression of glutamatergic function at the NMDA receptor (Manabe et al., 1998; Yu and Xie, 1998; Wei and Xie, 1999;

Bongsebandhu-phubhakdi and Manabe, 2007). Based on these findings, we hypothesized that NOP receptors may regulate recognition memory by interacting with NMDA receptor signaling in the hippocampus. As expected, the blockade of NMDA receptors with systemic administration of the non-competitive antagonist, MK-801 (0.1 mg/kg), significantly reduced learning-induced ERK2 activation in the hippocampus (vehicle, 100 ± 9 ; MK-801, 29 ± 7 ; $p < 0.01$; $n = 6$ per treatment). MK-801 also impaired discrimination performances in the choice trial (vehicle, 71 ± 3 ; MK-801, 55 ± 6 ; $p < 0.05$; $n = 11$ and 12 per treatment), confirming the requirement of the NMDA receptor in long-term recognition memory formation. Because MK-801 enhanced locomotor activity (vehicle, 3339 ± 234 ; MK-801, 4513 ± 288 ; $p < 0.05$) and object exploration (vehicle, 6.6 ± 0.8 ; MK-801, 20.2 ± 4.0 ; $p < 0.05$) during the familiarization trial, we tested whether the amnesic effects of this psychotomimetic could relate to impaired perception and attention. We studied the effects of MK-801 (0 and 0.1 mg/kg, $n = 7$ and 8 per treatment) on recall, as we did with Ro64-6198. MK-801 produced a marked locomotor hyperactivity during the choice trial ($p < 0.01$) (supplemental Table 4, available at www.jneurosci.org as supplemental material), but had no effect on object exploration times (n.s. for both objects) (supplemental Table 4, available at www.jneurosci.org as supplemental material). Despite the hyperlocomotion, MK-801-treated mice accurately discriminated the familiar object from the novel one (vehicle, 65 ± 6 ; MK-801, 64 ± 4 , n.s.), indicating that the NMDA receptor antagonist did not interfere with information retrieval processes.

In search of a functional interaction between NOP and NMDA receptors, we studied the effects of coadministration of silent doses of Ro64-6198 (0.3 mg/kg) and MK-801 (0.01 mg/kg) on activated hippocampal ERK ($n = 4$ –6 per treatment) (Fig. 3A) and memory performances ($n = 7$ –8 per treatment) (Fig. 3B). Overall ANOVA revealed a significant main effect of treatment on activated ERK2 level in the hippocampus ($F_{(3,21)} = 9.7$; $p < 0.05$), and *post hoc* analysis indicated that only the combination significantly suppressed ERK2 activation ($p < 0.01$, Fig. 3A). In the object recognition task, all drug treatments enhanced locomotor activity and exploration time during the familiarization trial ($F_{(3,25)} = 11.2$; $p < 0.05$) (supplemental Table 5, available at www.jneurosci.org as supplemental material). In the subsequent choice trial, only the combination significantly impaired long-term recognition memory ($p < 0.01$) (Fig. 3B), in such a manner that mice were unable to discriminate between the novel and the familiar object (DI not different from chance level, n.s.). Together, these results indicate that hippocampal MAPK/ERK is one of the biochemical pathways mediating NOP and NMDA receptors influence on long-term recognition memory formation.

NOP and NMDA receptors differentially regulate spontaneous hippocampal ERK and JNK activities

In this series of experiments, we examined whether Ro64-6198 and MK-801 could affect basal pERK and pJNK levels in the hippocampus. Western immunoblotting analyses were performed on hippocampi of mice that received Ro64-6198 (0.3, 1, and 3 mg/kg, $n = 4$ per dose) or MK-801 (0.1 and 0.3 mg/kg, $n = 4$ –5 per dose) in their home cage. None of the pharmacological treatments affected total ERK or JNK levels in the hippocampus (data not shown). Similarly, none of the Ro64-6198 doses tested changed baseline pERK2 or pJNK levels ($F_{(3,12)} = 0.1$, n.s., and

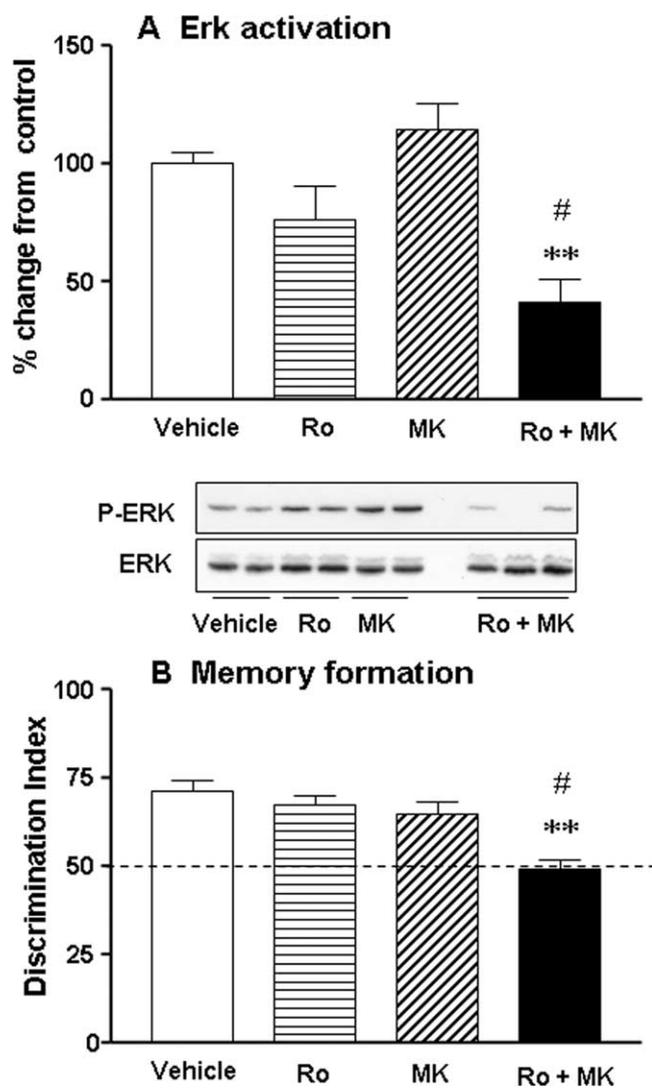


Figure 3. NOP and NMDA receptors modulate recognition memory formation through common hippocampal ERK-dependent mechanisms. **A**, Western blots represent the phosphorylated and total forms of ERK2 30 min after the familiarization trial. Ro64-6198 (0.3 mg/kg) and MK-801 (0.01 mg/kg) were administered separately or concurrently before the familiarization trial ($n = 2-3$ mice per treatment represented). Histograms represent the mean percentage of change from the vehicle-treated group \pm SEM for normalized pERK2 immunoreactivity for each pharmacological treatment ($n = 4-6$ per treatment). **B**, Coadministration of Ro64-6198 (0.3 mg/kg) and MK-801 (0.01 mg/kg) synergistically impairs long-term recognition memory ($n = 7-8$ per treatment). Data are represented as the mean discrimination index \pm SEM. The dashed line shows a chance level of 50%. ** $p < 0.01$, significantly different from vehicle-treated group and #significantly different from all other groups.

$F_{(3,12)} = 0.9$, n.s., respectively) (Table 1). It should be pointed out that the highest dose (3 mg/kg) impaired home cage activity as it produced a clear sedation (Higgins et al., 2001; Reiss et al., 2008). However, NMDA receptor blockade with MK-801 resulted in strong dephosphorylation of pERK2 ($F_{(2,10)} = 4.5$; $p < 0.05$) as well as pJNK in the hippocampus ($F_{(2,10)} = 30.5$; $p < 0.05$), and significant effects were detected with 0.3 mg/kg dose for both MAPKs ($p < 0.05$ for both) (Table 1).

Finally, we found no evidence for a synergistic interaction between Ro64-6198 (1 mg/kg) and MK-801 (0.1 mg/kg) under resting conditions (n.s.) (Table 1), suggesting that the facilitatory effects of NMDA receptor on spontaneous hippocampal ERK and JNK activities may be independent of NOP receptor modulation. Together, these results show that NOP and NMDA recep-

Table 1. Effects of Ro64-6198 and MK-801 administered alone or concurrently on basal PERK and P-JNK levels in the hippocampus

Treatment	P-ERK (% control)	P-JNK (% control)
Ro64-6198 (mg/kg, i.p.)		
Vehicle ($n = 4$)	100 \pm 30	100 \pm 15
0.3 ($n = 4$)	101 \pm 18	73 \pm 14
1 ($n = 4$)	110 \pm 12	75 \pm 17
3 ($n = 4$)	93 \pm 22	87 \pm 8
MK-801 (mg/kg, s.c.)		
Vehicle ($n = 4$)	100 \pm 21	100 \pm 15
0.1 ($n = 5$)	89 \pm 27	102 \pm 12
0.3 ($n = 4$)	36 \pm 8*	38 \pm 5*
Ro64-6198 + MK-801		
Vehicle ($n = 4$)	100 \pm 19	100 \pm 4
1 + 0.1 mg ($n = 4$)	71 \pm 36	77 \pm 18

Mice were given Ro64-6198 or MK-801 injections separately or concurrently in the home cage, and changes in basal P-ERK and P-JNK levels were assessed 30 min later. Data are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$ versus vehicle-treated group.

tors differentially contribute to the modulation of basal ERK and JNK signaling in the hippocampus.

Discussion

The present study shows that N/OFQ-NOP receptor system negatively modulates formation of long-term recognition memory through ERK-dependent signaling mechanisms in the hippocampus. This modulation is in part mediated by antagonism of glutamatergic function at the NMDA receptor. The lack of effect of NOP receptor activation on basal pERK level further suggests that N/OFQ modulatory role is activity-dependent as recently demonstrated by electrophysiological approaches (Manabe et al., 1998; Bongsebandhu-phubhakdi and Manabe, 2007).

Previous studies have demonstrated the role of N/OFQ-NOP receptor system in working memory, spatial and fear learning (Hiramatsu and Inoue, 1999; Redrobe et al., 2000; Higgins et al., 2002; Mamiya et al., 2003; Sandin et al., 2004; Roozendaal et al., 2007), but the contribution of this novel neuropeptide system in modulation of recognition memory have not been investigated. Here, we show that intracerebroventricular infusion of N/OFQ or systemic administration of the selective NOP receptor agonist, Ro64-6198, impairs long-term object recognition memory formation in mice. Ro64-6198 also enhanced object investigation, an effect that seems to reflect a genuine stimulant action of this agonist as it was observed after the exposure of mice to a novel as well as to a familiar object (supplemental Table 5, available at www.jneurosci.org as supplemental material). Furthermore, low doses (<0.1 nmol) of N/OFQ itself were reported to enhance exploratory behavior in mice (Florin et al., 1996; Kamei et al., 2004). Most importantly, at doses increasing exploration, Ro64-6198 treatment had no effects on acquisition or short-term memory, and also failed to affect recall performances regardless of the retention delay (3 or 24 h). These findings strongly suggest that the NOP receptor agonist selectively interferes with mnemonic processes related to long-term consolidation processes. This is in line with previous studies showing that N/OFQ abolishes long-term retention of fear conditioning and passive avoidance when administered post-training (Mamiya et al., 2003; Roozendaal et al., 2007). Interestingly, when injected into the dorsal hippocampus, N/OFQ severely impaired long-term recognition memory formation, without any apparent effects on sensorimotor functions. Furthermore, the amnesic effects of Ro64-6198 were reversed by coadministration of the selective NOP receptor antagonist, UFP-101, thus confirming that they are

mediated by hippocampal NOP receptors. Together, these results extend previous studies showing that N/OFQ negatively modulates spatial learning in the hippocampus (Sandin et al., 1997; Sandin et al., 2004). They also suggest that the dorsal hippocampus is the critical brain structure mediating the amnesic effects we observed after systemic or intracerebroventricular administrations of the NOP receptor agonists.

Hippocampal ERK/MAPK plays a central role in different types of memories, including contextual fear conditioning, inhibitory passive avoidance and spatial memory (Sweatt, 2004; Davis and Laroche, 2006; Giovannini, 2006). However, its involvement in recognition memory formation is still unclear. Whereas Kelly et al. (2003) showed an upregulation of ERK phosphorylation in the hippocampus of rats tested in the object recognition task, these results were not observed in mice (Kamei et al., 2006; Nagai et al., 2007). One possible reason for this discrepancy could be the differences in the time-points used for quantifications of pERK changes in the hippocampus. Indeed, as reported by Nagai et al. (2007) (see also Kamei et al., 2006), we found no changes in hippocampal pERK levels immediately after exposure to a novel object. In contrast, a robust activation was observed 30 min later, a time-point that approximately corresponds to the study by Kelly et al. (2003). Furthermore, pharmacological inhibition of ERK pathway after systemic administration of SL327 (Nagai et al., 2007; present study) or intrahippocampal infusions of PD98059 (Nagai et al., 2007) prevented long-term recognition memory formation in mice, thus confirming the necessity of this signaling pathway in consolidation processes.

Upstream activation of ERK pathway may occur via many neurotransmitter receptors that facilitate memory formation. The NMDA subtype of glutamate receptor was previously shown to be an upstream component of hippocampal ERK activation in fear conditioning (Atkins et al., 1998). Here, we demonstrate that this is also the case in the object recognition task, as illustrated by the disruptive effects of the noncompetitive antagonist MK-801 on ERK activation and long-term memory. The amnesic effects of MK-801 cannot be attributed to altered baseline synaptic transmission, because no changes in spontaneous ERK and JNK activities were detected under resting conditions at the 0.1 mg/kg dose. Furthermore, MK-801 failed to affect recall performances, which also rules out a nonspecific action on perception. These findings are in broad agreement with those reported in the literature showing that systemic or intrahippocampal NMDA receptor blockade impairs long-term consolidation of object recognition memory (Baker and Kim, 2002; de Lima et al., 2005). The NMDA receptor can activate ERK via multiple Ca^{2+} -dependent signaling transduction pathways, including the Ras/Raf/MEK and cAMP-dependent cascades (Poser and Storm, 2001; Sweatt, 2004). After activation, ERK processes several events relevant for establishing long-term memory. In particular, ERK translocates to the nucleus to initiate the transcriptional activity necessary for synaptic plasticity and long-term consolidation processes (Poser and Storm, 2001; Sweatt, 2004).

Previous *in vitro* studies reported stimulatory actions of N/OFQ on ERK signaling pathways in cell lines transfected with NOP receptor (Fukuda et al., 1997; New and Wong, 2002). Here, we show that in living animals NOP receptor activation inhibits ERK pathway in the hippocampus. Most importantly, we found a clear association between the suppressive effects of Ro64-6198 on ERK activation and recognition memory formation. The lack of effects of Ro64-6198 on basal pERK level indicates that NOP receptors may primarily modulate changes mediated by other

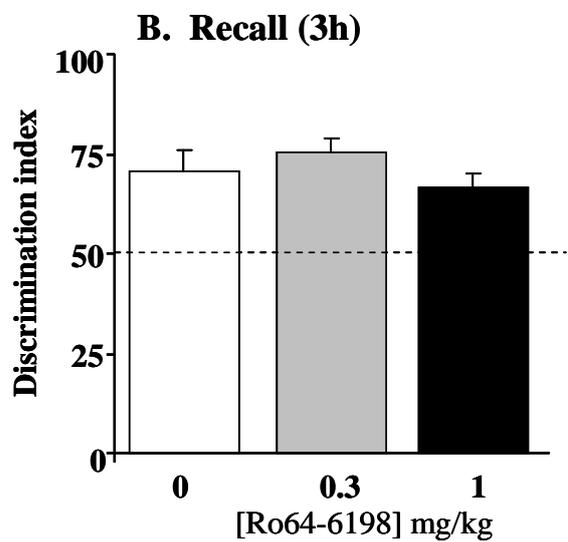
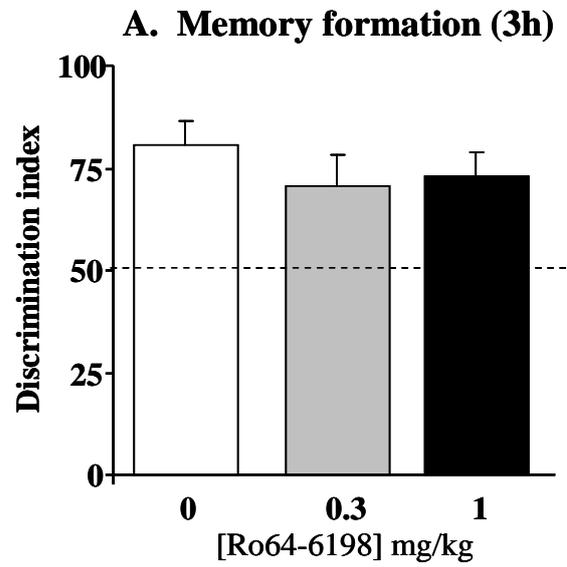
neurotransmitter systems, which are triggered during learning. The similarity of the profile of action of Ro64-6198 and MK-801 at behavioral and molecular levels strongly point toward a functional antagonism between N/OFQ and glutamatergic systems. Furthermore, combined treatments with subthreshold doses produced a synergistic inhibition of memory performances and ERK activation. These results are complementary to those reported in *NOP receptor* knock-out mice showing that antagonism of N/OFQ transmission improves fear memory through NMDA receptor-dependent mechanisms (Mamiya et al., 2003). They also provide the first evidence that NOP and NMDA receptors converge on common ERK pathway in the hippocampus to regulate memory formation. However, it cannot be excluded that the amnesic effects of Ro64-6198 might also involve a cholinergic component (Cavallini et al., 2003; Uezu et al., 2005) that is known to contribute to recognition memory formation (Dodart et al., 1997; Bertaina-Anglade et al., 2006) and to activate ERK cascade in neurons (Rosenblum et al., 2000; Giovannini, 2006; Steiner et al., 2007).

Functional interaction between NOP and NMDA receptors may involve both presynaptic and postsynaptic mechanisms. For instance, this could occur at the level of neuronal circuitry, as N/OFQ was shown to suppress synaptic transmission in many brain regions, including the hippocampus, through presynaptic inhibition of neurotransmitters release (Meis, 2003). NOP receptors are also located on interneurons and pyramidal cells throughout the hippocampus (Houtani et al., 2000), and can therefore directly modulate NMDA receptor function at the postsynaptic level. Consistent with this view, electrophysiological studies showed that exogenous as well as endogenous N/OFQ potently inhibits NMDA receptor-dependent long-term potentiation through direct action on pyramidal and granule cells in the hippocampus (Yu and Xie, 1998; Bongsebandhu-phubhakdi and Manabe, 2007). NOP receptor is a G-protein-coupled receptor that negatively regulates the activity of adenylate cyclases, inhibits voltage-gated Ca^{2+} channels and activates inward rectifying K^{+} channels. By blocking Ca^{2+} current and inhibiting cAMP production (New and Wong, 2002), NOP receptor can suppress the activation of multiple cascades that ultimately converge on ERK, and thereby disrupts NMDA receptor-mediated recognition memory formation. In this regard, Mamiya et al. (2003) have shown that NOP and NMDA receptors modulate in an opposing manner the activity of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) in hippocampal slice. CaMKII was proposed to act as a trigger of Ras/Raf/MEK cascade (Micheau and Riedel, 1999; Blitzer et al., 2005), and may thus be one potential upstream target that could relay the influences of NOP and NMDA receptors on ERK activity at postsynaptic level. Our failure to detect an effect of Ro64-6198 and MK-801 cotreatments on spontaneous ERK activity indicates that the cross talk between NOP and NMDA receptors may particularly take place in behaviorally relevant situations, such as those involving learning. The lack of effect of the high doses of Ro64-6198 (3 mg/kg) on spontaneous ERK activity further suggest that NOP receptors do not modulate this signaling cascade under resting conditions, unlike NMDA receptors. All together, the above findings show that NOP receptor negatively modulates ERK signaling cascade in the hippocampus. This inhibitory action is particularly potent in learning conditions, when the tonic activity of other neurotransmitters that promote ERK phosphorylation, such as glutamate, is enhanced.

References

- Atkins CM, Selcher JC, Petraitis JJ, Trzaskos JM, Sweatt JD (1998) The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nat Neurosci* 1:602–609.
- Baker KB, Kim JJ (2002) Effects of stress and hippocampal NMDA receptor antagonism on recognition memory in rats. *Learn Mem* 9:58–65.
- Bertaina-Anglade V, Enjuanes E, Morillon D, Drieu la Rochelle C (2006) The object recognition task in rats and mice: a simple and rapid model in safety pharmacology to detect amnesic properties of a new chemical entity. *J Pharmacol Toxicol Methods* 54:99–105.
- Blitzer RD, Iyengar R, Landau EM (2005) Postsynaptic signaling networks: cellular cogwheels underlying long-term plasticity. *Biol Psychiatry* 57:113–119.
- Bongsebandhu-phubhakdi S, Manabe T (2007) The neuropeptide nociceptin is a synaptically released endogenous inhibitor of hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci* 27:4850–4858.
- Cavallini S, Marino S, Beani L, Bianchi C, Siniscalchi A (2003) Nociceptin inhibition of acetylcholine efflux from different brain areas. *NeuroReport* 14:2167–2170.
- Chiou LC, Liao YY, Fan PC, Kuo PH, Wang CH, Riemer C, Prinszen EP (2007) Nociceptin/orphanin FQ peptide receptors: pharmacology and clinical implications. *Curr Drug Targets* 8:117–135.
- Darland T, Grandy DK (1998) The orphanin FQ system: an emerging target for the management of pain? *Br J Anaesth* 81:29–37.
- Daumas S, Halley H, Frances B, Lassalle JM (2005) Encoding, consolidation, and retrieval of contextual memory: differential involvement of dorsal CA3 and CA1 hippocampal subregions. *Learn Mem* 12:375–382.
- Davis S, Laroche S (2006) Mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase signalling and memory stabilization: a review. *Genes Brain Behav* 5 [Suppl 2]:61–72.
- de Lima MN, Laranja DC, Bromberg E, Roesler R, Schroder N (2005) Pre- or post-training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impairs object recognition memory in rats. *Behav Brain Res* 156:139–143.
- Dodart JC, Mathis C, Ungerer A (1997) Scopolamine-induced deficits in a two-trial object recognition task in mice. *NeuroReport* 8:1173–1178.
- Fischer A, Radulovic M, Schrick C, Sananbenesi F, Godovac-Zimmermann J, Radulovic J (2007) Hippocampal Mek/Erk signaling mediates extinction of contextual freezing behavior. *Neurobiol Learn Mem* 87:149–158.
- Florin S, Suaudeau C, Meunier JC, Costentin J (1996) Nociceptin stimulates locomotion and exploratory behaviour in mice. *Eur J Pharmacol* 317:9–13.
- Fukuda K, Shoda T, Morikawa H, Kato S, Mori K (1997) Activation of mitogen-activated protein kinase by the nociceptin receptor expressed in Chinese hamster ovary cells. *FEBS Lett* 412:290–294.
- Giovannini MG (2006) The role of the extracellular signal-regulated kinase pathway in memory encoding. *Rev Neurosci* 17:619–634.
- Higgins GA, Grottick AJ, Ballard TM, Richards JG, Messer J, Takeshima H, Pauly-Evers M, Jenck F, Adam G, Wichmann J (2001) Influence of the selective ORL1 receptor agonist, Ro64-6198, on rodent neurological function. *Neuropharmacology* 41:97–107.
- Higgins GA, Kew JN, Richards JG, Takeshima H, Jenck F, Adam G, Wichmann J, Kemp JA, Grottick AJ (2002) A combined pharmacological and genetic approach to investigate the role of orphanin FQ in learning and memory. *Eur J Neurosci* 15:911–922.
- Hiramatsu M, Inoue K (1999) Nociceptin/orphanin FQ and nocistatin on learning and memory impairment induced by scopolamine in mice. *Br J Pharmacol* 127:655–660.
- Houtani T, Nishi M, Takeshima H, Sato K, Sakuma S, Kakimoto S, Ueyama T, Noda T, Sugimoto T (2000) Distribution of nociceptin/orphanin FQ precursor protein and receptor in brain and spinal cord: a study using in situ hybridization and X-gal histochemistry in receptor-deficient mice. *J Comp Neurol* 424:489–508.
- Jenck F, Wichmann J, Dautzenberg FM, Moreau JL, Ouagazzal AM, Martin JR, Lundstrom K, Cesura AM, Poli SM, Roeveer S, Kolczewski S, Adam G, Kilpatrick G (2000) A synthetic agonist at the orphanin FQ/nociceptin receptor ORL1: anxiolytic profile in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:4938–4943.
- Kamei J, Matsunawa Y, Miyata S, Tanaka S, Saitoh A (2004) Effects of nociceptin on the exploratory behavior of mice in the hole-board test. *Eur J Pharmacol* 489:77–87.
- Kamei H, Nagai T, Nakano H, Togan Y, Takayanagi M, Takahashi K, Kobayashi K, Yoshida S, Maeda K, Takuma K, Nabeshima T, Yamada K (2006) Repeated methamphetamine treatment impairs recognition memory through a failure of novelty-induced ERK1/2 activation in the prefrontal cortex of mice. *Biol Psychiatry* 59:75–84.
- Kelly A, Laroche S, Davis S (2003) Activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in hippocampal circuitry is required for consolidation and reconsolidation of recognition memory. *J Neurosci* 23:5354–5360.
- Liu EH, Lee TL, Nishiuchi Y, Kimura T, Tachibana S (2007) Nocistatin and its derivatives antagonize the impairment of short-term acquisition induced by nociceptin. *Neurosci Lett* 416:155–159.
- Mamiya T, Yamada K, Miyamoto Y, Konig N, Watanabe Y, Noda Y, Nabeshima T (2003) Neuronal mechanism of nociceptin-induced modulation of learning and memory: involvement of N-methyl-D-aspartate receptors. *Mol Psychiatry* 8:752–765.
- Manabe T, Noda Y, Mamiya T, Katagiri H, Houtani T, Nishi M, Noda T, Takahashi T, Sugimoto T, Nabeshima T, Takeshima H (1998) Facilitation of long-term potentiation and memory in mice lacking nociceptin receptors. *Nature* 394:577–581.
- Meis S (2003) Nociceptin/orphanin FQ: actions within the brain. *Neuroscientist* 9:158–168.
- Meis S, Pape HC (1998) Postsynaptic mechanisms underlying responsiveness of amygdaloid neurons to nociceptin/orphanin FQ. *J Neurosci* 18:8133–8144.
- Meunier JC, Mollereau C, Toll L, Suaudeau C, Moisand C, Alviner P, Butour JL, Guillemot JC, Ferrara P, Monsarrat B, et al (1995) Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature* 377:532–535.
- Micheau J, Riedel G (1999) Protein kinases: which one is the memory molecule? *Cell Mol Life Sci* 55:534–548.
- Nagai T, Takuma K, Kamei H, Ito Y, Nakamichi N, Ibi D, Nakanishi Y, Murai M, Mizoguchi H, Nabeshima T, Yamada K (2007) Dopamine D1 receptors regulate protein synthesis-dependent long-term recognition memory via extracellular signal-regulated kinase 1/2 in the prefrontal cortex. *Learn Mem* 14:117–125.
- Neal Jr CR, Mansour A, Reinscheid R, Nothacker HP, Civelli O, Watson Jr SJ (1999a) Localization of orphanin FQ (nociceptin) peptide and messenger RNA in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol* 406:503–547.
- Neal Jr CR, Mansour A, Reinscheid R, Nothacker HP, Civelli O, Akil H, Watson Jr SJ (1999b) Opioid receptor-like (ORL1) receptor distribution in the rat central nervous system: comparison of ORL1 receptor mRNA expression with (125)I-[(14)Tyr]orphanin FQ binding. *J Comp Neurol* 412:563–605.
- New DC, Wong YH (2002) The ORL1 receptor: molecular pharmacology and signalling mechanisms. *Neurosignals* 11:197–212.
- Paxinos G, Franklin KBJ (2001) The mouse brain in stereotaxic coordinates, Ed 2. San Diego: Academic.
- Poser S, Storm DR (2001) Role of Ca²⁺-stimulated adenylyl cyclases in LTP and memory formation. *Int J Dev Neurosci* 19:387–394.
- Redrobe JP, Calo G, Guerrini R, Regoli D, Quirion R (2000) [Nphe(1)]-Nociceptin (1–13)NH(2), a nociceptin receptor antagonist, reverses nociceptin-induced spatial memory impairments in the Morris water maze task in rats. *Br J Pharmacol* 131:1379–1384.
- Reinscheid RK, Nothacker HP, Bourson A, Ardati A, Henningsen RA, Buzow JR, Grandy DK, Langen H, Monsma Jr FJ, Civelli O (1995) Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. *Science* 270:792–794.
- Reiss D, Wichmann J, Tekeshima H, Kieffer BL, Ouagazzal AM (2008) Effects of nociceptin/orphanin FQ receptor (NOP) agonist, Ro64-6198, on reactivity to acute pain in mice: Comparison to morphine. *Eur J Pharmacol* 579:141–148.
- Rooszdaal B, Lengvilas R, McGaugh JL, Civelli O, Reinscheid RK (2007) Orphanin FQ/nociceptin interacts with the basolateral amygdala noradrenergic system in memory consolidation. *Learn Mem* 14:29–35.
- Rosenblum K, Futter M, Jones M, Hulme EC, Bliss TV (2000) ERK1/II regulation by the muscarinic acetylcholine receptors in neurons. *J Neurosci* 20:977–985.
- Sandin J, Georgieva J, Schott PA, Ogren SO, Terenius L (1997) Nociceptin/orphanin FQ microinjected into hippocampus impairs spatial learning in rats. *Eur J Neurosci* 9:194–197.
- Sandin J, Ogren SO, Terenius L (2004) Nociceptin/orphanin FQ modulates

- spatial learning via ORL-1 receptors in the dorsal hippocampus of the rat. *Brain Res* 997:222–233.
- Selcher JC, Atkins CM, Trzaskos JM, Paylor R, Sweatt JD (1999) A necessity for MAP kinase activation in mammalian spatial learning. *Learn Mem* 6:478–490.
- Steiner RC, Heath CJ, Picciotto MR (2007) Nicotine-induced phosphorylation of ERK in mouse primary cortical neurons: evidence for involvement of glutamatergic signaling and CaMKII. *J Neurochem* 103:666–678.
- Sweatt JD (2001) The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J Neurochem* 76:1–10.
- Sweatt JD (2004) Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol* 14:311–317.
- Uezu K, Sano A, Sei H, Toida K, Houtani T, Sugimoto T, Suzuki-Yamamoto T, Takeshima H, Ishimura K, Morita Y (2005) Enhanced hippocampal acetylcholine release in nociceptin-receptor knock-out mice. *Brain Res* 1050:118–123.
- Wei WZ, Xie CW (1999) Orphanin FQ suppresses NMDA receptor-dependent long-term depression and depotentiation in hippocampal dentate gyrus. *Learn Mem* 6:467–477.
- Yu TP, Xie CW (1998) Orphanin FQ/nociceptin inhibits synaptic transmission and long-term potentiation in rat dentate gyrus through postsynaptic mechanisms. *J Neurophysiol* 80:1277–1284.
- Yu TP, Fein J, Phan T, Evans CJ, Xie CW (1997) Orphanin FQ inhibits synaptic transmission and long-term potentiation in rat hippocampus. *Hippocampus* 7:88–94.



Supplementary Figure 1

Supplementary Table 1. N/OHQ effects on exploration parameters during the familiarization trial.

<i>Treatment (nmol)</i>	Familiarization trial	
	<i>LMA (cm)</i>	<i>T₁A (s)</i>
<i>N/OHQ i.c.v.</i>		
CSF (n=6)	2684 ± 228	10.6 ± 1.6
0.1 (n=6)	3226 ± 307	7.2 ± 0.8
0.3 (n=7)	3030 ± 222	7.8 ± 1.7
1 (n=7)	2365 ± 292	7.3 ± 0.6
<i>N/OHQ D.Hipp.</i>		
CSF (n=8)	4173 ± 198	10.2 ± 1.1
1 (n=7)	3398 ± 435	10.7 ± 2.2
3 (n=9)	3490 ± 489	11.0 ± 1.4

Mice were given intracerebroventricular (i.c.v.) or intra-hippocampal (D.Hipp.) injections of artificial cerebrospinal fluid (CSF) or N/OHQ before the familiarization trial and tested drug-free 24 hours later in the choice trial. LMA: total locomotor activity, T₁A: object A exploration time during the familiarization trial. Data are expressed as mean ± s.e.m.

Supplementary Table 2. Effects of SL327 and Ro64-6198 on exploration parameters during the familiarization trial.

<i>Treatment (mg/kg)</i>	Familiarization trial	
	<i>LMA (cm)</i>	<i>T_{1A} (s)</i>
<i>SL327 (i.p.)</i>		
Vehicle (n=8)	2325 ± 391	7.2 ± 1.2
50 (n=9)	2473 ± 190	8.1 ± 1.5
<i>Ro64-6198 (i.p.)</i>		
Vehicle (n=10)	3111 ± 186	8.0 ± 1.0
0.3 (n=9)	3469 ± 205	11.0 ± 1.5
1 (n=9)	3132 ± 155	16.9 ± 1.4**

Mice were given SL327 or Ro64-6198 before the familiarization trial and tested drug-free 24 hours later. LMA: total locomotor activity, T_{1A}: object A exploration time. Data are expressed as mean ± s.e.m. **p<0.01 significantly different vs. vehicle-treated group.

Supplementary Table 3. UFP-101 and Ro64-6198 effects on exploration parameters.

	Familiarization trial	
<i>Treatment</i>	<i>LMA (cm)</i>	<i>T_{1A} (s)</i>
Vehicles (n=6)	3372 ± 388	7.3 ± 1.0
UFP-101 (n=7)	4893 ± 660	8.8 ± 0.7
Ro64-6198 (n=7)	4599 ± 693	10.7 ± 1.0
UFP-101+ Ro64-6198 (n=7)	5155 ± 602	10.0 ± 1.3

Mice were given systemic Ro64-6198 (1mg/kg, i.p) or intra-hippocampal UFP-101 (5nmol/side) injections separately or concurrently before the familiarization trial and tested drug-free 24 hours later in the choice trial. Control group received the corresponding vehicles. LMA: total locomotor activity, T_{1A}: object A exploration time during the familiarization trial. Data are expressed as mean ± sem.

Supplementary Table 4. Effects of Ro64-6198 and MK-801 on exploration parameters during the choice trial.

<i>Treatment (mg/kg)</i>	Choice trial		
	<i>LMA (cm)</i>	<i>T₂A (s)</i>	<i>T₂B (s)</i>
Ro64-6198 (i.p.)			
Vehicle (n=10)	3658±191	2.2±0.2	6.5±1.8
0.3 (n=10)	3613±258	3.5±0.7	11.8±1.9
1 (n=11)	3894±436	7.4±2.2*	14.5±2.1*
MK-801 (s.c.)			
Vehicle (n=7)	2943±311	3.2±0.7	5.9±1.5
0.1 (n=8)	4565±221**	4.6±1	8.5±1.9

Mice were submitted to the familiarization trial drug-free and tested 24 hours later in the choice trial under either Ro64-6198 or MK-801 treatment. LMA: total locomotor activity, T₂A: object A (familiar) exploration time and T₂B: object B (novel) exploration time. Data are expressed as mean ± s.e.m.. * p<0.05 and ** p<0.01 vs. vehicle-treated group.

Supplementary Table 5. Effects of Ro64-6198 and MK-801 administered alone or concurrently on exploration parameters during the familiarization trial.

<i>Treatment</i>	Familiarization trial	
	<i>LMA (cm)</i>	<i>T₁A (s)</i>
Vehicles (n=8)	3525 ± 186	10.7 ± 1.5
Ro64-6198 (n=7)	4199 ± 136*	25.9 ± 3.9**
MK-801 (n=7)	4767 ± 231*	16.8 ± 2.3*
Ro64-6198+MK-801(n=7)	4781 ± 156*	22.3 ± 2.0**

Mice were given Ro64-6198 (0.3 mg/kg, i.p.) and MK-801 (0.01 mg/kg, s.c.) injections separately or concurrently before the familiarization trial and tested drug-free 24 hours later. Control group received the corresponding vehicles. LMA: total locomotor activity, T₁A: object A exploration time during the familiarization trial. Data are expressed as mean ± s.e.m. * p<0.05 and **p<0.01 vs. vehicle-treated group.

2.3. Discussion

Influence de l'activation des RNOP sur l'acquisition de la mémoire de reconnaissance

La reconnaissance -faculté à se souvenir d'une rencontre précédente- est une composante essentielle de la mémoire déclarative chez l'humain. Celle-ci est altérée dans de nombreuses pathologies neurodégénératives ou suite à des accidents (Hajilou and Done, 2007; Lee et al., 2003). Le diagnostic de plusieurs formes d'amnésies chez l'humain repose sur la capacité à reconnaître des visages ou des objets. Le paradigme de reconnaissance d'objets adapté au singe puis au rongeur est aujourd'hui largement utilisé pour étudier les processus cognitifs et les substrats neuronaux qui régissent certains aspects de la mémoire déclarative (Winters et al., 2008). Ce paradigme basé sur la tendance naturelle des rongeurs à explorer la nouveauté, s'affranchit de tout processus de renforcement (appétitif ou aversif), et s'avère propice à l'étude de chacune des différentes étapes de la mémoire de reconnaissance, soit l'acquisition, la rétention ou le rappel. Selon la procédure expérimentale utilisée, il permet également d'étudier différentes stratégies de reconnaissance (familiarité vs. recollection) mise en œuvre lors du rappel (Dere et al., 2007; Winters et al., 2008). La procédure utilisée dans notre étude inclut la présentation d'un seul objet dans une arène familière lors de l'étape d'acquisition, puis l'introduction le jour du test d'un objet nouveau dans une position précédemment inoccupée. Simplifiée, cette procédure visait tout d'abord à établir un niveau d'apprentissage robuste entraînant de bonnes performances de reconnaissance (index de discrimination de 70-75%) afin d'étudier les mécanismes à l'origine des perturbations mnésiques à long terme (délai de 24 heures), induites pharmacologiquement.

L'activation des RNOP par l'agoniste Ro64-6198 administré par voie périphérique, ou par l'injection intra-cérébro-ventriculaire (i.c.v.) de N/OFQ avant l'étape de familiarisation induit des déficits de reconnaissance, démontrant ici pour la première fois l'action inhibitrice du système nociceptinergique sur la formation de la mémoire de reconnaissance. La similitude des profils d'action amnésiants du Ro64-6198 et de la N/OFQ confirme l'utilité de cet agoniste synthétique en tant qu'outil de choix pour l'étude de la fonction des RNOP centraux. La dose efficace de Ro64-6198 (1 mg/kg) augmente significativement la durée d'exploration de l'objet. Il convient donc de vérifier que les effets moteurs du Ro64-6198 ne causent pas de troubles de la perception ou des capacités attentionnelles (Higgins et al., 2002; Mamiya et al., 1998) lors de l'étape de d'acquisition. Nos données indiquent clairement que les effets

observés ne sont pas secondaires à l'un de ces facteurs confondants. En premier lieu, la durée d'exploration de l'objet augmente sous Ro64-6198, alors que les performances mnésiques subséquentes diminuent, indiquant qu'aucune corrélation directe ne peut être établie entre ces deux effets. Ensuite, l'administration de 1 mg/kg de Ro64-6198 avant l'étape d'acquisition n'affecte pas les performances de reconnaissance évaluées après un court délai (3 heures), ce qui suggère que les fonctions perceptives et attentionnelles requises pour les processus d'acquisition de cette tâche sont préservées sous l'influence du Ro64-6198. De plus, son administration avant l'étape de discrimination (rappel) ne modifie pas non plus les performances de discrimination, que celles-ci soit évaluées 3h ou 24h après l'acquisition. Ceci indique, outre le fait que l'activation des RNOP n'affecte pas les processus de rappel de l'information, que l'attention et la perception ne sont pas altérées. Nous avons également étudié les effets du Ro64-6198 sur la mémoire de travail, dans la tâche du labyrinthe en Y (cf. figure 13). Dans cette condition, la dose de 1 mg/kg de Ro64-6198 n'affecte pas les performances d'alternance spontanée, ce qui suggère une mémoire de travail préservée, ainsi que des aptitudes attentionnelles et perceptives fonctionnelles. Par contre, la dose élevée de 3 mg/kg perturbe l'alternance, mais ces effets semblent secondaires à la perturbation de l'activité locomotrice suite à la sédation. Plusieurs animaux ont d'ailleurs été éliminés de l'étude car ils n'atteignaient pas le critère minimum de 5 entrées nécessaires pour calculer un pourcentage d'alternance. Ainsi les déficits de discrimination observés suite à l'administration de Ro64-6198 semblent refléter spécifiquement une altération des processus mnésiques qui sous-tendent la formation de la mémoire de reconnaissance à long terme.

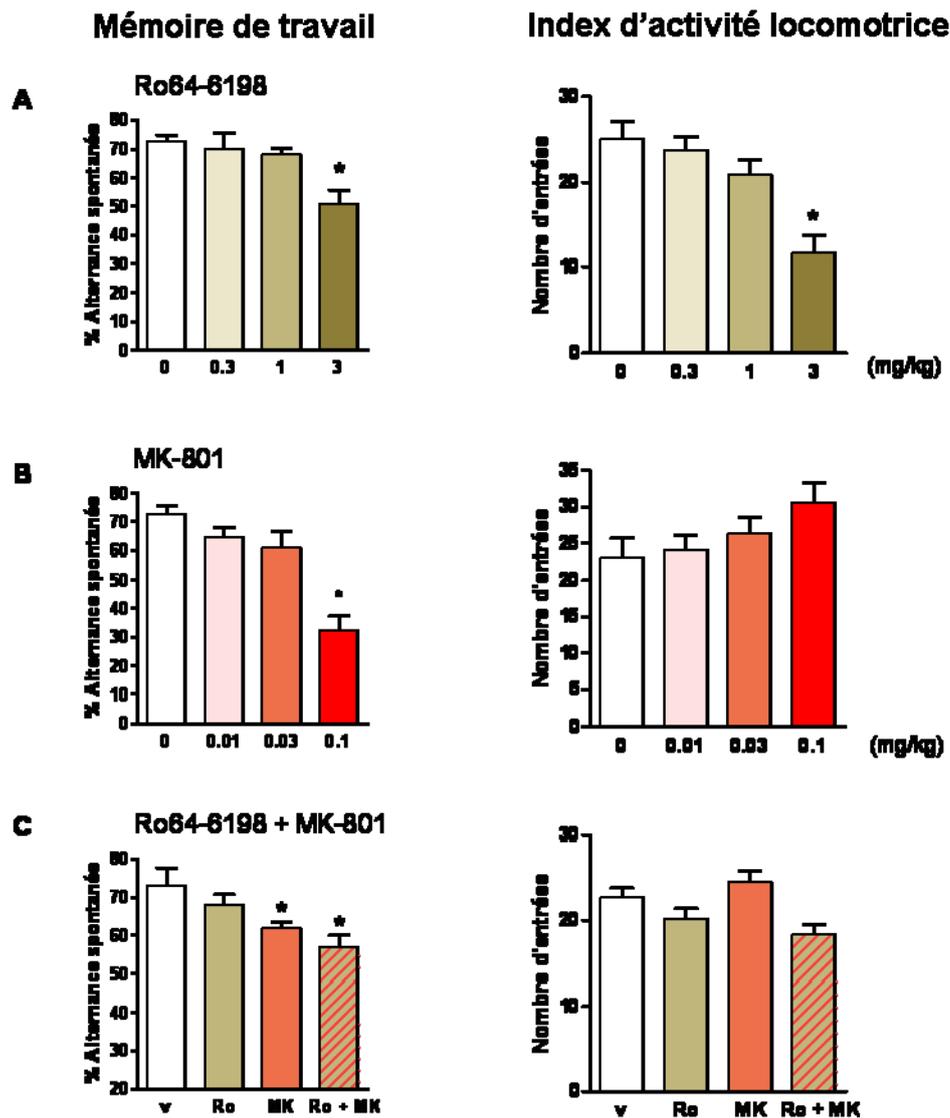
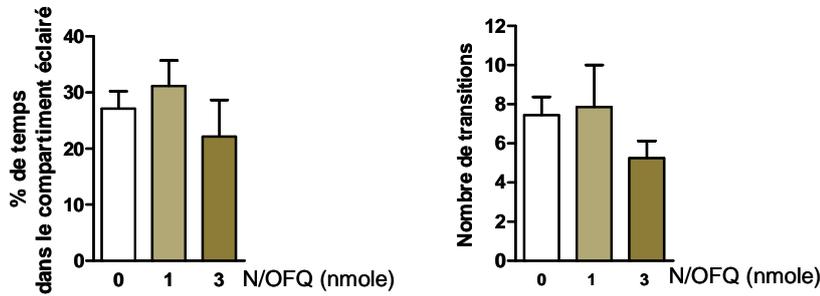


Figure 13: Effet du Ro64-6198 et du MK-801 sur les performances d'alternance spontanée évaluées dans un labyrinthe en Y.

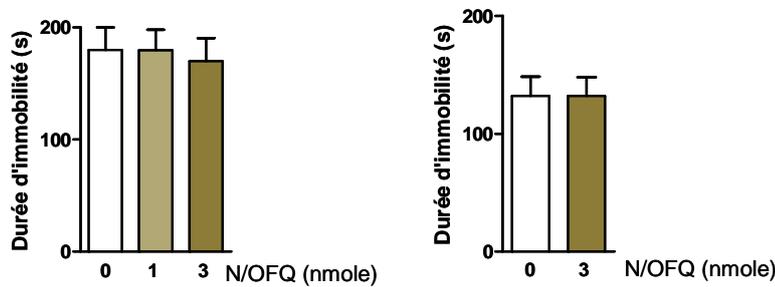
Les souris sont déposées dans un labyrinthe formé de trois bras orientés à 120° et explorent librement le labyrinthe pendant 5 minutes. Le nombre d'entrées (index d'activité) et l'ordre des bras parcourus sont recueillis. Une alternance est définie comme 3 entrées successives dans les 3 bras du labyrinthe, et le % d'alternance spontanée est utilisé comme index des performances de mémoire de travail. (A) Le Ro64-6198 (0-0.3-1-3mg/kg, i.p) administré 30 min avant le début du test diminue significativement les performances d'alternance spontanée à la dose de 3 mg/kg (à gauche) qui affecte aussi le nombre d'entrées dans les bras du labyrinthe (à droite), paramètre servant d'index d'activité locomotrice. (B) Le MK-801 (0-0.01-0.03-0.1 mg/kg, i.p.) administré 30 minutes avant le début du test perturbe les performances d'alternance spontanée (à gauche) à la dose de 0.1mg/kg, sans influencer l'activité locomotrice (à droite). (C) La combinaison de doses de Ro64-6198 (1 mg/kg) et de MK-801(0.03 mg/kg) infra efficaces, affecte l'alternance spontanée au même titre que le MK-801 administré seul (à gauche) sans affecter le nombre d'entrées (à droite). * $p < 0.05$ indique une différence significative suite à l'analyse à posteriori (Fisher PLSD) par rapport au groupe traité avec le véhicule.

Rôle des RNOP hippocampiques

A: Comportements anxieux



B: Comportements de résignation



C: Vérification du site d'injection au niveau de l'hippocampe dorsal

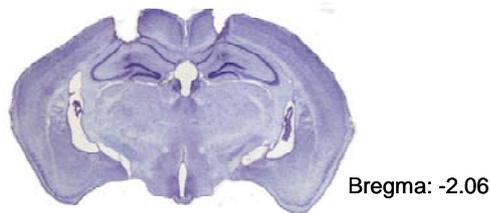


Figure 14: Influence de la N/OFQ injectée au niveau de l'hippocampe dorsal sur les conduites émotionnelles.

La N/OFQ (1 ou 3 nmole/hippocampe) ou le liquide céphalo-rachidien artificiel sont injectés grâce à une seringue Hamilton montée surmicropompe, dans un volume de 0.25 μ l pendant 2 minutes (0.125 μ l/min), 2 min avant le début des tests. **(A)** La N/OFQ intra-hippocampique n'affecte pas les comportements anxieux évalués dans le test de la boîte claire/obscur par le pourcentage de temps passé dans le compartiment éclairé (à gauche) ou le nombre de transitions vers celui-ci (à droite). **(B)** La N/OFQ intra-hippocampique n'affecte pas les comportements de résignation mesurés par la durée d'immobilité dans le test de la nage forcée (à gauche) ni dans le test de suspension caudale (à droite). **(C)** Exemple de contrôle histologique du placement des canules et du site d'injection au sein de l'hippocampe dorsal. Exemple de coupe de cerveau de 25 μ m effectuée à -2mm du bregma, puis marquée au violet de crésyle.

L'administration locale de N/OFQ au niveau de l'hippocampe dorsal avant l'étape d'acquisition perturbe également la reconnaissance à long terme. La dose efficace de N/OFQ (3 nmole), administrée selon ces mêmes conditions, n'affecte pas les conduites émotionnelles qu'elles soient associées à l'anxiété (boîte claire/obscur), ou au comportement de résignation (nage forcée et de suspension caudale, cf. introduction 2ème partie et figure 14). Compte tenu de l'implication du système nociceptinergique dans la régulation des fonctions émotionnelles, l'absence d'effet sur les comportements associés à l'anxiété et la résignation est plutôt inattendue. Ceci semble indiquer qu'au niveau de l'hippocampe dorsal, l'activation des RNOP induit des déficits sélectivement mnésiques. Ceci nous permet tout d'abord de s'assurer que les effets amnésiques observés suite à l'administration intra-hippocampique de N/OFQ ne sont pas secondaires à une perturbation des fonctions émotionnelles, et confirme l'influence du système nociceptinergique de l'hippocampe dorsal sur les processus d'acquisition. D'autre part, l'antagonisme des RNOP de l'hippocampe dorsal par l'UFP-101 contrecarre les effets du Ro64-6198 administré par voie périphérique, indiquant que les effets amnésiques de ce composé sont en partie médiés par l'hippocampe dorsal. Il est d'ailleurs intéressant de noter que l'UFP-101 seul n'affecte pas ici les performances à long terme, mais une étude approfondie incluant une dose-réponse serait nécessaire pour déterminer l'implication du système nociceptinergique hippocampique endogène dans la modulation des processus mnésiques.

Il est peu probable que les effets observés suite à l'administration de la N/OFQ ou de l'UFP-101 dans l'hippocampe dorsal résultent d'une action sur d'autres structures suite à une diffusion. En effet, nous avons contrôlé la spécificité anatomique des effets observés en injectant la dose de N/OFQ active (3nmole), au niveau du cortex somato-sensoriel situé en position immédiatement dorsale par rapport à l'hippocampe. La N/OFQ injectée dans le cortex somato-sensoriel avant l'étape d'acquisition n'affecte pas la reconnaissance à long terme, confirmant la spécificité anatomique des effets obtenus ainsi qu'une diffusion limitée dans nos conditions grâce au volume d'injection réduit employé (0,25 µl). Nous mettons ainsi en évidence que l'hippocampe dorsal représente l'un des sites d'action central des effets amnésiques conséquents à l'activation des RNOP. Toutefois, nous n'excluons pas un engagement des cortex périrhinal, enthorinal ou préfrontal voire même pariétal suite aux injections i.c.v. ou i.p., ces structures étant toutes impliquées dans la formation de la mémoire de reconnaissance chez l'homme comme chez l'animal (Barker et al., 2007; Squire et al.,

2007). En effet, la faculté de reconnaissance lors de la discrimination peut reposer sur deux stratégies distinctes, qui engageraient la formation d'une trace mnésique dans des substrats neuronaux différents. Ainsi le cortex périrhinal, aire associative sensorielle, pourrait encoder les caractéristiques individuelles des objets (Winters et al., 2004) permettant la reconnaissance par la familiarité. Par contre l'hippocampe serait nécessaire à la formation de la représentation de l'objet dans son contexte spatial et temporel (Dere et al., 2007; Eichenbaum, 2000) et à la reconnaissance par stratégie de recollection « de type épisodique » de la présentation antérieure de l'objet. Dans notre tâche, la reconnaissance pourrait s'effectuer par l'une ou l'autre de ces stratégies. En effet, elle s'effectue dans une arène ouverte ou de nombreux indices spatiaux sont disponibles. D'autre part, l'objet nouveau présente à la fois des caractéristiques et une position nouvelle dans l'arène. L'administration de N/OFQ par voie i.c.v. ou de Ro64-6198 par voie systémique pourrait ici perturber les fonctions corticales rhinales ou hippocampiques lors de l'acquisition. La reconnaissance par familiarité est étroitement liée à la durée d'exploration et au délai de rétention (Hammond et al., 2004; Mumby et al., 2007) et nous suggérons que notre critère d'exploration minimum lors de la phase d'acquisition (3 s) s'avère insuffisant pour une discrimination indépendante de l'hippocampe, après un délai de rétention de 24 h, par simple stratégie de familiarité. En effet, l'injection de N/OFQ dans l'hippocampe dorsal diminue drastiquement les performances de reconnaissance à long terme, ce qui suggère que la stratégie employée implique un hippocampe fonctionnel lors des processus d'acquisition. Par contre la faculté de reconnaissance préservée à court terme suite à l'administration systémique de Ro64-6198 pourrait en partie s'expliquer par une reconnaissance par stratégie de familiarité. Cette dissociation entre effets à court (3 h) et long terme (24 h) du Ro64-6198 suggère que le système nociceptinergique n'influence pas dans nos conditions l'acquisition ou l'encodage de l'information, mais interfère préférentiellement avec les processus liés à la consolidation à long terme de celle-ci, particulièrement au sein de l'hippocampe.

Mémoire de reconnaissance et signalisation ERK dans l'hippocampe

Les processus d'apprentissage à long terme, qu'il s'agisse d'associations implicites simples ou de formes de mémoire explicite plus complexes (Barco et al., 2006), dépendent de la néosynthèse protéique et impliqueraient une étape de régulation transcriptionnelle et traductionnelle (Dudai, 2002). L'activation de voies de signalisations intracellulaires en

réponse à l'activité neuronale, capables de recruter des facteurs de transcription et d'induire l'expression génique participe aux phénomènes de plasticité synaptique chez l'animal (Wang et al., 2006). Les voies de signalisation des MAPK ont ainsi fait l'objet d'une attention particulière ces dernières années car elles sont capables d'activer plusieurs facteurs de transcription. En particulier, ERK1/2 semble jouer un rôle crucial dans la plasticité qu'elle soit induite par l'exposition aux drogues d'abus (Girault et al., 2007; Valjent et al., 2001) ou par l'apprentissage (Davis and Laroche, 2006; Klann and Sweatt, 2008; Micheau and Riedel, 1999). L'implication de la voie des JNK/MAPK reste plus controversée, certaines études n'impliquant pas directement ces kinases dans la reconnaissance gustative (Berman et al., 1998) alors que d'autres rapportent son activation obligatoire au sein de l'hippocampe pour le développement et l'extinction de la peur apprise (Bevilaqua et al., 2003; Bevilaqua et al., 2007). Nous rapportons ici que la voie de signalisation JNK ne semble pas recrutée dans l'hippocampe dans les processus de consolidation précoce. Au contraire, une augmentation robuste de la phosphorylation de ERK2 (normalisée par rapport à l'exploration de l'arène vide) est détectée 30 minutes après l'étape d'acquisition attestant de l'implication de cette voie. En accord avec ceci, l'inhibition de l'activité de MEK1/2, une MAPKK directement en amont de ERK1/2 (SL-327), prévient l'augmentation de la phosphorylation de ERK2 ainsi que la formation de la mémoire de reconnaissance à long terme. Nos données confirment ainsi la nécessité de l'activation de cette voie au niveau de l'hippocampe pour la formation de la mémoire de reconnaissance ou sa reconsolidation (Fernandez et al., 2008; Kelly et al., 2003; Nagai et al., 2007). Des données récentes indiquent également que la consolidation de la mémoire de reconnaissance à long terme (24 h), mais non à court terme (1 h 30), requière une synthèse protéique au sein de l'hippocampe dorsal (Balderas et al., 2008). Ceci conforte l'idée que l'activation et la translocation nucléaire de ERK pourrait représenter un mécanisme central dans l'induction de la transcription au sein de l'hippocampe, processus précédant l'étape de synthèse protéique lors de la consolidation à long terme.

Interaction fonctionnelle entre RNOP et RNMDA

L'activation de ERK est requise pour les phénomènes de potentialisation à long terme, un mécanisme cellulaire étroitement associé aux processus de plasticité qui dépendent du RNMDA (Sweatt, 2004; Thomas and Huganir, 2004). Nous avons de ce fait étudié l'implication du RNMDA dans l'activation de ERK associée à la formation de la mémoire de

reconnaissance. Le blocage des RNMDA par le MK-801 avant l'étape d'acquisition réduit fortement le taux de ERK phosphorylé dans l'hippocampe, ainsi que les capacités de discrimination après 24 heures de délai. Ces données confirment la nécessité de RNMDA fonctionnels pour la formation de la mémoire de reconnaissance à long terme (de Lima et al., 2005; Karasawa et al., 2008; Nilsson et al., 2007; Pitsikas et al., 2008). L'antagonisme des récepteurs NMDA au niveau de l'hippocampe dorsal (Baker and Kim, 2002) reproduit ces effets et il a été récemment mis en évidence que leur blocage après l'étape d'acquisition limite l'activation de ERK, et perturbe en parallèle la mémoire de reconnaissance (Lewis et al., 2008). Ceci laisse envisager que les effets du MK-801 administré par voie systémique dans notre étude, pourrait être médiés par les RNMDA hippocampiques.

De façon intéressante, le Ro64-6198 administré à une dose élevée (3 mg/kg) ne modifie pas le taux basal de ERK phosphorylé dans l'hippocampe en condition de repos (cage d'hébergement). Contrairement au Ro64-6198, une forte dose de MK-801 (0.3 mg/kg) réduit le taux de phosphorylation basal de ERK et de JNK, indiquant que le RNMDA est impliqué dans le contrôle tonique de l'expression de ces voies de signalisation. Ces données suggèrent que le RNOP interviendrait plus spécifiquement moduler une activation de ERK induite par d'autres systèmes de neurotransmission, facilitateurs des processus mnésiques. Ainsi, l'activation des RNOP et le blocage des récepteurs NMDA paraît produire des déficits de reconnaissance à long terme par le biais d'une inhibition de la voie de signalisation ERK. Plusieurs données de la littérature rapportent une interaction entre ces deux récepteurs. La N/OFQ inhibe les processus de LTP qui dépendent du RNMDA au niveau des neurones principaux de l'hippocampe (Bongsebandhu-phubhakdi and Manabe, 2007; Wei and Xie, 1999; Yu and Xie, 1998), et une hyperactivité des RNMDA a été décrite suite à la délétion constitutive des RNOP chez la souris (Mamiya et al., 2003). Nous avons cherché à révéler cet antagonisme fonctionnel *in vivo*. L'administration conjointe de MK-801 et de Ro64-6198 aux doses infra efficaces a révélé une action inhibitrice synergique de ces composés sur la reconnaissance à long terme et l'activation de ERK en situation d'apprentissage. Nous concluons que le système nociceptinergique s'oppose à l'action du système glutamatergique, pour réguler les mécanismes de plasticité moléculaire qui sous-tendent la formation de la mémoire de reconnaissance.

Couplage du RNOP à la voie de signalisation des MAPK

L'influence directe du système nociceptinergique sur la voie de signalisation des MAPK n'avait jamais été explorée auparavant dans le système nerveux central. Seules quelques études *in vivo* ont été réalisées sur des préparations d'artères chez le cochon et avancent que l'activation des RNOP stimule la phosphorylation des MAPK ERK et JNK (Armstead, 2006; Ross and Armstead, 2005). Récemment, il a été montré que l'inhibition pharmacologique de la voie de signalisation ERK dans le noyau accumbens bloque les effets nociceptifs de la N/OFQ, mais sa stimulation en réponse à l'activation du RNOP n'a pas été démontrée dans cette étude (Chen et al., 2008). Ici, nous rapportons une diminution de l'activation de ERK dans l'hippocampe consécutive à l'activation du RNOP, en condition d'apprentissage, alors qu'aucun effet n'est détectable en condition basale. Ces données ne corroborent pas les études précédentes établies *in vitro*, réalisées en modèles cellulaires qui surexpriment le RNOP. En effet, une activation des MAPK, ERK, JNK et p38 (Lou et al., 1998; New and Wong, 2002) ou de certains IEGs, est rapportée en réponse à l'application de N/OFQ (Ring et al., 2006). Cette activation, (Leroy et al., 2007) interviendrait par le biais de plusieurs voies en amont, dont l'activation de la PKC et la voie PI3K/SOS/Ras (New and Wong, 2002). Nous suggérons ici que les voies de couplage privilégiées entre le récepteur NOP et la signalisation ERK dans l'hippocampe, diffèrent de celles décrites *in vitro*. Ceci a déjà été mis en évidence pour les RCPGi/o sérotoninergique 5-HT_{1A} et adrénergique α_2 sur des préparations en tranches d'hippocampe (Raymond et al., 1999). Toutefois, plusieurs études évoquent une modulation qui ne dépend pas uniquement du couplage des RCPG dans le système nerveux, mais plutôt de leur identité (Houslay and Kolch, 2000; Vanhoose et al., 2002), et du type cellulaire considéré (Berkeley and Levey, 2003). Nous n'excluons pas la possibilité qu'une activation du récepteur NOP stimule la phosphorylation de ERK au niveau d'autres structures cérébrales, ou dans d'autres fenêtres de temps, ou encore selon l'identité neurochimique des neurones considérés. Il est également envisageable que la diminution de ERK observée dans l'hippocampe résulte d'un effet indirect, par le biais d'un réseau de structure. En effet, l'activation du RNOP est capable de diminuer la libération de neurotransmetteurs, dont le glutamate (Moran et al., 2000). Situé en position présynaptique, il pourrait agir en inhibant la libération de glutamate au niveau de la formation hippocampique, en provenance des projections des aires corticales associatives par exemple. Le manque d'anticorps spécifiques dirigés contre le RNOP ne permet pas la cartographie du RNOP au sein des types cellulaires

de l'hippocampe, ou de sa co-localisation avec ERK phosphorylé, limitant ainsi les moyens disponibles pour clarifier la nature directe ou indirecte de ces effets.

Les voies de signalisation des récepteurs NOP et NMDA convergent sur ERK1/2?

ERK peut être activé par plusieurs voies de signalisations, Ras-dépendantes ou non (Thomas and Huganir, 2004). La voie Ras est classiquement activée par les récepteurs aux tyrosine kinases ou aux neurotrophines, mais peut également intervenir par le biais du calcium. Une voie alternative de couplage majoritairement neuronale, de l'AMPC/PKA à ERK a été décrite (Adams and Sweatt, 2002) dans les processus de plasticité, qui pourrait intervenir par l'intermédiaire de rap1 et B-raf (Grewal et al., 2000; Morozov et al., 2003) Largement impliquée dans les processus de plasticité à long terme qui dépendent de l'activité synaptique (Adams and Sweatt, 2002; Klann and Sweatt, 2008), cette voie de signalisation pourrait constituer un mécanisme privilégié de régulation des processus mnésiques par les RCPG à neuropeptides, comme le RNOP. En effet, l'activité du récepteur NOP couplé aux protéines Gi/o inhibe la production d'AMPC et pourrait de ce fait diminuer l'activation de ERK par cette voie *in vivo*, lors des processus de consolidation mnésique. Cette inhibition pourrait également refléter une diminution de l'entrée calcique voltage dépendante (cf. figure 2), et donc une action par le biais de la voie ras. Les voies de couplage en le Ca²⁺ et Ras ne sont pas clairement établies, mais pourraient être contrôlée en amont par la CamKII ou la PKC (cf. figure 12). Compte tenu de l'expression importante des RNMDA et des RNOP au sein des neurones pyramidaux et granulaires de l'hippocampe, nous proposons qu'une interaction directe entre cibles intracellulaires de ces récepteurs soit envisageable au niveau post-synaptique et pourrait ultimement converger sur ERK. De telles interactions, ont été mis en évidence *ex vivo*, au niveau de la CamKII. (Mamiya 2003). Le blocage du canal du récepteur NMDA (MK-801) et l'activation du RNOP (Ro64-6198) diminuent l'entrée de Ca²⁺ et pourraient ainsi inhiber ERK par l'intermédiaire préférentiel de la voie Ca²⁺/Ras/Raf/MEK. D'autre part la convergence pourrait avoir lieu plus en aval par l'intermédiaire de l'inhibition de la voie AMPC/PKA/Rap1/BRaf/MEK par le RNOP. A l'état basal, l'absence d'inhibition sur les cibles communes aux récepteurs NOP et NMDA révélée ici, suggèrent une modulation privilégiée de ERK consécutive à une activité hippocampique soutenue, comme lors d'un apprentissage par exemple.

La dissociation des effets du Ro64-6198 à court et long terme suggère que les modifications de signalisation mises en évidence affectent surtout les processus de plasticité à long terme qui dépendent du RNMDA. Cependant, l'activation de ERK dans l'hippocampe a également été impliquée dans les processus de mémoire à court terme (Alonso et al., 2002; Quevedo et al., 2004). La phosphorylation de ERK peut aussi contrôler les modifications d'efficacité synaptique régulant la plasticité à court terme dans l'hippocampe, tels que la modulation de la conductance de canaux K^+ (Adams et al., 2000a; Yuan et al., 2002) ou l'insertion à la membrane de récepteurs AMPA (Zhu et al., 2002), qui augmentent l'excitabilité neuronale. La méthode de détection de ERK que nous employons ici ne permet pas la localisation de la phosphorylation de ERK1/2 en terme de types ou de compartiments cellulaires (pré- vs. post-synaptique, ou cytoplasmique vs. Nucléaire). La phosphorylation observée dans l'hippocampe rapidement après l'étape d'acquisition, pourrait ainsi participer à la fois aux processus de plasticité à court et long terme. En effet des pools de ERK1/2 distincts, définis par leur localisation pré ou post-synaptiques ou leur compartimentalisation (cytoplasmique dendritique ou associée au cytosquelette, membranaires ou nucléaires), atteignent probablement des cibles distinctes (Boggio et al., 2007). Récemment, le rôle d'une kinase inhibitrice de ras (kinase suppressor of ras 1, KSR1) interagissant uniquement avec les pools de ERK membranaires, phosphorylés par la voie PKC dépendante, à été mis en évidence dans l'hippocampe (Shalin et al., 2006). Malgré le recoupement de nombreuses voies de signalisation sur ERK, cette kinase est un exemple des mécanismes envisageables *in vivo* pour le maintien en aval de la spécificité des voies recrutées, permettant l'induction d'une réponse appropriée, à court ou long terme par exemple.

Conclusion

Dans leur ensemble, nos données montrent l'implication du système nociceptinergique dans les processus de mémoire de reconnaissance. Nous proposons que l'inhibition la voie de signalisation ERK hippocampique lors de la consolidation mnésique, fasse partie des mécanismes neuronaux moléculaires conduisant aux déficits de mémoire à long terme induits par l'activation du récepteur NOP. Nous révélons aussi un antagonisme fonctionnel entre RNOP et RNMDA au niveau des performances mnésiques et la transduction du signal de la voie ERK/MAPK. Ainsi, le système nociceptinergique perturbe la mémoire de reconnaissance en interférant avec les processus de consolidation à long terme engageant la voie de signalisation ERK de l'hippocampe, qui est sous contrôle du récepteur NMDA.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Notre travail a permis de mettre en évidence, grâce à la manipulation pharmacologique du récepteur NOP (RNOP), que le système nociceptinergique exerce une influence inhibitrice sur les fonctions cognitives et que cette action modulatrice dépendrait de la tâche mnésique considérée. En effet, l'activation du RNOP entraîne des perturbations marquées de la mémoire de reconnaissance à long terme et de la mémoire contextuelle aversive, deux processus mnésiques qui dépendent étroitement de l'intégrité fonctionnelle de la formation hippocampique. En revanche, sa stimulation n'a aucun effet sur la mémoire de travail, la mémoire de peur élémentaire ou encore les capacités de rappel. La manipulation de l'activité des RNOP directement au niveau de l'hippocampe dorsal nous a permis de confirmer l'action délétère du système nociceptinergique hippocampique sur les fonctions mnésiques, et en particulier sur la formation de la mémoire de reconnaissance. Toutefois, la dissociation entre les effets mnésiques à court et long terme obtenus dans la tâche de reconnaissance d'objet, suggère que le système nociceptinergique module surtout les processus de consolidation à long terme. En effet, nous avons montré que cette action s'exercerait par le biais de l'inhibition de la voie de signalisation intracellulaire ERK, dont l'activation au niveau de l'hippocampe est centrale pour le processus de consolidation à long terme de la trace mnésique. Par contre, la stimulation du RNOP n'influence pas le seuil basal d'activité des MAPK ERK et JNK, indiquant que ces voies de signalisations ne seraient pas sous contrôle nociceptinergique dans des conditions de repos. Ces données suggèrent ainsi que l'influence inhibitrice de la N/OFQ sur les fonctions hippocampique s'exercerait en fonction de la pertinence de la situation comportementale.

De façon intéressante, nous avons mis en évidence que la stimulation de la transmission nociceptinergique au niveau de l'hippocampe dorsal n'affecte pas les conduites émotionnelles. En raison des propriétés anxiolytiques connues de la N/OFQ et du Ro64-6198 (Dautzenberg et al., 2001; Griebel et al., 1999; Jenck et al., 2000; Varty et al., 2005; Vitale et al., 2006; Wichmann et al., 2000), et de l'implication de l'hippocampe dorsal dans la régulation des fonctions émotionnelles (Engin and Treit, 2007; File et al., 2000; Gray and McNaughton, 1996; Kalueff, 2007), cette absence d'effet est plutôt inattendue. Ces données indiquent qu'au niveau de l'hippocampe dorsal, le système nociceptinergique participerait

préférentiellement à la régulation des fonctions mnésiques. Une telle spécificité d'action paraît s'accorder avec la notion de fonctions hippocampiques duelles, émotionnelle et cognitive, distribuées selon un gradient continu entre pôles temporal et septal (Bannerman et al., 2004; Bast, 2007). L'étude de du rôle du système nociceptinergique au sein de l'hippocampe ventral dans les processus émotionnels et cognitifs paraît à cet égard fondamentale pour une compréhension plus approfondie du rôle du système nociceptinergique hippocampique.

Dans l'ensemble notre travail montre que l'activation du système nociceptinergique n'affecte pas de manière plus large les fonctions hippocampique de manière générale, à l'image d'une stimulation GABAergique par exemple, comme cela a été suggéré (Heinricher, 2003). Le système nociceptinergique interviendrait plus particulièrement pour réguler finement le déclenchement de certains processus comme la consolidation à long terme, en réponse à une activité neuronale au cours de l'apprentissage. Dans ce contexte, l'activation du RNOP s'opposerait à l'action promnésiante de systèmes de neurotransmission, tel que le système glutamatergique par le biais du récepteur NMDA. En effet, nous avons révélé l'existence d'un antagonisme fonctionnel entre les RNOP et RNMDA qui s'exerce à la fois au niveau comportemental et au niveau moléculaire, par le biais de la voie de signalisation ERK hippocampique. Ces données nous ont amené à conclure que l'influence inhibitrice du système nociceptinergique sur les fonctions hippocampique reposerait, en partie, sur une modulation de l'activité du système glutamatergique. Cependant, l'absence d'une synergie d'action de Ro64-6198 et de MK-801 sur la mémoire de travail et la mémoire émotionnelle aversive élémentaire montre clairement que l'action facilitatrice du RNMDA sur certaines fonctions mnésiques échapperait à un contrôle inhibiteur du récepteur NOP. Dans leur ensemble nos données suggèrent que le système nociceptinergique joue un rôle dynamique dans la modulation des fonctions cognitives qui dépend à la fois des processus mnésiques considérés et des circuits neuronaux qu'ils engagent.

Nous avons étudié les relations fonctionnelles entre le système nociceptinergique et glutamatergique au travers d'un seul type de récepteur glutamatergique et d'une seule structure (l'hippocampe). Il serait donc intéressant d'élargir notre étude à d'autres membres de récepteurs glutamatergique (AMPA, métabotropiques) et à d'autres structures (amygdale...), ce qui permettrait de mieux élucider la nature des relations fonctionnelles

qu'entretiennent ces deux systèmes au niveau du système limbique. Une piste particulièrement intéressante et inexploitée à ce jour serait de vérifier si cet antagonisme fonctionnel entre systèmes nociceptinergique et glutamatergique s'exercerait lors du phénomène d'extinction de la peur apprise. Compte tenu de l'action inhibitrice du N/OFQ sur l'expression des comportements de peur, ceci pourrait s'avérer de première importance dans la compréhension des mécanismes qui sous-tendent le développement de troubles émotionnels associés à l'anxiété, comme les phobies ou le stress post traumatique. Finalement, il est fort probable que les effets amnésiques observés résultent d'un effet combiné des agonistes des RNOP sur plusieurs systèmes de neurotransmission. En particulier, les systèmes cholinergiques centraux ont été largement impliqués dans les processus mnésiques (Hasselmo, 2006) et leur défaillance dans plusieurs pathologies neurodégénératives s'accompagne de troubles mnésiques. Le système cholinergique est d'ailleurs également couplé à la voie ERK au sein de l'hippocampe (Giovannini, 2006), et pourrait de ce fait constituer une autre cible privilégiée de modulation des processus mnésiques par le système nociceptinergique.

Afin de déterminer la contribution de la phosphorylation de ERK observée au sein de l'hippocampe aux mécanismes de plasticité à long terme et de préciser l'influence des récepteurs NOP sur ceux-ci, il aurait été intéressant de quantifier séparément les fractions nucléaire et cytoplasmique de ERK1/2. En effet, une réduction d'activation des pools nucléaires de ERK pourrait engendrer une réduction de l'activité transcriptionnelle, considérée comme essentielle pour la formation de la mémoire à long terme. Nous avons envisagé une autre approche permettant d'aborder cette question, en construisant, en partenariat avec l'Institut Clinique de la Souris, un modèle de souris transgénique rapportant la transcription du gène immédiat précoce zif-268 (e-GFP sous contrôle du promoteur zif-268), directement en aval de ERK (Valjent et al., 2006). Grâce à cette approche il serait possible d'obtenir à la fois une cartographie temporelle, qui permettrait d'élucider l'effet de la stimulation du RNOP sur les vagues d'activations successives impliquées dans la consolidation mnésique, et une cartographie spatiale de la régulation de l'activité transcriptionnelle en aval de ERK au niveau de réseau de structures cérébrales suite à un apprentissage. Le manque crucial d'anticorps dirigés contre le RNOP nous mène également à envisager la construction d'une souris « knock-in », chez laquelle le RNOP natif sera remplacé par le RNOP couplé à un fluorophore, comme cela a déjà été réalisé pour le

récepteur delta aux opioïdes au laboratoire (Scherrer et al., 2006). Ces outils permettront la cartographie de l'expression du récepteur NOP, notamment au sein des types cellulaires hippocampiques, mais également l'étude fonctionnelle de sa régulation endogène lors des processus de mémoire et d'apprentissage, ou suite à sa simple activation pharmacologique. Surtout, cette approche permettra la co-localisation du RNOP et du RNMDA au sein de neurones hippocampiques exprimant une augmentation du taux de ERK1/2 phosphorylé en réponse à un apprentissage. Cette information cruciale permettra d'éclaircir la nature directe ou indirecte, des interactions qui s'exercent entre systèmes glutamatergique et nociceptinergique au niveau cellulaire.

**CARACTERISATION COMPORTEMENTALE DE
L'ETAT D'ABSTINENCE PROLONGEE A LA
MORPHINE CHEZ LA SOURIS**

INTRODUCTION

L'addiction est une pathologie chronique récidivante qui se développe suite à une consommation répétée de drogues d'abus. Depuis des siècles, l'utilisation des opiacés a été détournée de sa fonction première analgésique à des fins hédoniques, en raison de leurs propriétés psychotropes et de la sensation d'apaisement et d'euphorie qu'ils produisent. Ils agissent au travers du récepteur mu aux opioïdes, fortement exprimés dans les circuits mésocorticolimbiques, dits de la récompense, qui comprennent des projections dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale vers le noyau accumbens, l'amygdale, l'hippocampe ou encore le cortex. En situation physiologique, le système de la récompense permet le renforcement positif de comportements essentiels à la survie, en associant un caractère plaisant (valence positive) aux activités de sustentation alimentaire et dipsique, d'interaction sociale ou de reproduction sexuelle. Ce système intervient en particulier dans les processus motivationnels orientant les comportements (« *goal-directed behavior* (Palmiter, 2008) vers la recherche de stimuli préalablement associés à une expérience hédonique. Les drogues d'abus, dont les opiacés, sont capables d'activer et d'usurper ce système et induisent une plasticité transcriptionnelle dans de nombreuses régions cérébrales, associée aux adaptations neuronales persistantes qui constituent les fondements de la pharmacodépendance (Ammon-Treiber and Holtt, 2005; Jones and Bonci, 2005; Kauer and Malenka, 2007; Nestler, 2001; Przewlocki, 2004). Ces adaptations engendrent des dysfonctionnements des processus de récompense (Koob and Le Moal, 2001; Koob and Le Moal, 2008), de motivation (Robinson and Berridge, 1993; Robinson and Berridge, 2001) et détournent les processus d'apprentissages associatifs visant normalement à automatiser des comportements de survie (Hyman, 2005).

D'après les critères de classification de l'organisation mondiale de la santé, la dépendance physique et psychologique à une substance se caractérise par la présence d'au moins 3 manifestations parmi les 6 suivantes :

- 1) Désir compulsif de consommer la drogue,
- 2) Difficulté à contrôler l'utilisation de la drogue,
- 3) Syndrome de sevrage à l'arrêt de la consommation,
- 4) Tolérance à l'effet psychotrope,

- 5) Abandon des autres sources d'intérêt,
- 6) Poursuite de la consommation de la substance malgré les conséquences préjudiciables (santé, économiques et sociales).

Le terme d'addiction regroupe à la fois les notions de dépendance psychologique et de dépendance physique, cette dernière se distinguant par l'apparition d'un syndrome de sevrage hautement aversif quelques heures après l'arrêt brutal de la consommation. Malgré un ensemble de symptômes impressionnants (mydriase, bouffées de chaleur et sueur alternées avec des frissons et une piloérection, salivation, vomissements, diarrhées, tachycardie...), le sevrage aux opiacés ne met pas en jeu le pronostic vital. La dépendance est une pathologie dynamique qui comprend une succession de phases : elle débute par l'initiation ou la prise de substances, suivi du maintien de la consommation, du sevrage puis de l'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 majeurs de la rechute et de la réinstauration de la consommation (Sinha, 2007). Celle-ci est rarement stable et conduit inévitablement à la rechute. L'addiction est de ce fait souvent conceptualisée comme une spirale dont l'amplitude augmente avec le nombre de répétitions de ce cycle (Koob and Le Moal, 2001; Koob and Le Moal, 2008), aboutissant à une pathologie psychiatrique. Fondamentalement, les traitements actuels visent à limiter les risques et les conséquences néfastes de la consommation d'opiacés mais non à maintenir un état abstinent. Le traitement par des opioïdes de substitution (méthadone, buprénorphine) permet 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). Suite à l'arrêt de la consommation récréative ou à la discontinuation d'un traitement de substitution, un syndrome d'abstinence prolongée apparaît, une fois les symptômes physiques de sevrage liés à la désintoxication dissipés (Satel et al., 1993; Shi et al., 2007). Il inclut un état anxieux et des modifications de l'humeur (dysphorie, épisodes dépressifs), des insomnies, l'irritabilité, la frustration, l'augmentation de l'appétit et/ou une prise de poids, ainsi que l'envie irrépressible de consommer le produit (*craving*).

Addiction et dépression

L'addiction et la dépression sont des pathologies qui présentent une co-morbidité importante. Sans pour autant indiquer des liens de causalité entre elles, ceci suggère des prédispositions (génétiques ou socio-économiques) et/ou des mécanismes physiopathologiques communs. La dépression présente une prévalence importante parmi les populations pharmaco-dépendantes (Nunes and Levin, 2006), et une dysphorie et/ou des épisodes dépressifs sont rapportés chez des sujets post-dépendants aux opiacés (Dole et al., 1991; Martin and Jasinski, 1969; Rounsaville et al., 1982). Malgré le suivi d'un traitement de substitution des études récentes rapportent le développement d'une condition psychiatrique de type dépressive dans 30% à 50% des cas (Gerra et al., 2006; Peles et al., 2007) ou de type personnalité anti-sociale limite, dans 20% des cas (Gerra et al., 2006). La dépression et le stress font partie des facteurs directement corrélés à la rechute chez des patients en cours de traitement substitutif (Brewer et al., 1998). Cet état affectif négatif est proposé comme un moteur orientant les comportements vers la recherche de la substance et la rechute, souvent interprétés comme des tentatives d'automédication (Childress et al., 1994; Koob and Le Moal, 2008).

Modélisation de la dépendance et du sevrage

Compte tenu des dimensions affective et cognitive impliquées dans les processus addictifs, la modélisation animale est délicate. La dépendance aux opioïdes peut toutefois être établie simplement de manière passive, par administration constante de morphine sous forme de pastilles ou de pompes sous-cutanées qui diffusent en continue, ou par des injections quotidiennes répétées de doses croissantes de morphine. Le mode d'administration par injections modélise mieux l'administration en bolus chez l'humain. Des symptômes de sevrage, témoignant de l'état de dépendance physique, surviennent spontanément au cours des 3 premiers jours qui suivent l'arrêt de l'administration en doses ascendantes chez la souris (Papaleo and Contarino, 2006) ou de manière plus intense quelques minutes après sa précipitation pharmacologique par l'antagonisme des récepteurs aux opioïdes (naloxone). Chez la souris, le sevrage se caractérise par l'apparition progressive de symptômes somatiques comme le saut, le tremblement des pattes, des secousses et des signes végétatifs dont le mouvement de mâchoire, la ptose, la piloérection, ou encore la diarrhée. L'intensité des symptômes est fonction de la dose et de la durée d'exposition préalable à la morphine et leur quantification permet l'évaluation de la sévérité de la dépendance physique. De façon

intéressante, une injection aigue de morphine suffit à engendrer un sevrage chez l'homme et la souris (Azolosa et al., 1994; Kest et al., 2002; Schulteis et al., 1997; Smits, 1975), mais nécessite des doses beaucoup plus importantes (morphine et/ou naloxone) et produit des différences quantitatives du nombre, de la durée et de l'ordre d'apparition des symptômes (Kest et al., 2001). L'état motivationnel qui accompagne l'expérience aversive du sevrage, qu'il soit spontané ou précipité, se caractérise par une augmentation des seuils d'autostimulation intra-cranienne (Kenny et al., 2006) et l'abolition des comportements opérant renforcés par la nourriture (Harris and Aston-Jones, 2003; Schulteis et al., 1997) ou par une solution sucrée (Zhang et al., 2007). Au contraire, les comportements motivés par la recherche d'opiacés seraient potentialisés (Harris and Aston-Jones, 2003). L'état affectif négatif associé au sevrage se traduit par un évitement du contexte associé au sevrage (conditionnement d'aversion de place), une sensibilité accrue au stress (Blatchford et al., 2005) et un état anxieux (Castilho et al., 2008; Harris and Aston-Jones, 1993).

Abstinence prolongée

Contrairement aux processus qui sous-tendent 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 issues de la modélisation animale d'une abstinence prolongée aux opiacés se concentrent actuellement sur les dysfonctionnements persistants du système de récompense. Le groupe d'Aston-Jones a mis en évidence une augmentation persistante (à 2 et 5 semaines d'abstinence) des propriétés récompensantes de la morphine (Harris and Aston-Jones, 2003) et une diminution du caractère renforçant d'un stimulus naturel comme la nourriture (Harris and Aston-Jones, 2007) chez le rat. Ces données ont été récemment confirmées par une diminution du caractère renforçant d'une eau sucrée, qui persiste jusqu'à 10 jours d'abstinence (Zhang et al., 2007). Ces modifications sont essentielles à la compréhension de l'adaptation à long terme des processus motivationnels qui sous-tendent l'exagération des comportements orientés vers la recherche de stimuli associés à la morphine. Toutefois, les dysfonctionnements hédoniques ne représentent qu'un aspect du syndrome d'abstinence, et une part importante de ces symptômes à trait aux altérations des fonctions émotionnelles qui contrôlent le niveau basal d'anxiété et de l'humeur.

Seules quelques études se sont intéressées à l'état d'abstinence aux opiacés chez le rat et suggèrent des modifications des conduites émotionnelles. Elles indiquent que le niveau d'anxiété est soit inchangé, lorsqu'il est évalué dans un labyrinthe en croix surélevé ou le test d'interaction sociale (Grasing et al., 1996), soit augmenté (Peregud et al., 2008) à 3 jours d'abstinence. 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)). Ainsi, malgré sa description comme un élément important du syndrome d'abstinence, un état anxieux généralisé prolongé reste variable selon les protocoles d'induction de la dépendance et les méthodes d'évaluation de l'anxiété utilisés chez le rat, et n'a jamais été mis en évidence chez la souris. Les comportements de résignation au cours de l'état abstinent ont également été peu caractérisés en dehors des situations mettant directement en jeu les processus de récompense (anhédonie). Une diminution du comportement de résignation dans le test de la nage forcée est rapportée après 1 à 2 jours d'abstinence, alors qu'une augmentation a été mise en évidence après 3 à 6 jours (Anraku et al., 2001; Molina et al., 1994) qui pourrait persister jusqu'à 3 semaines (Grasing and Ghosh, 1998) suite à l'exposition à une quantité de morphine importante chez le rat.

Systèmes aminergiques et dépendance

Les systèmes aminergiques, particulièrement dopaminergique et noradrénergique, participent à l'instauration de la dépendance ainsi qu'au sevrage aux opiacés. Les neurones dopaminergiques mésolimbiques sont classiquement impliqués dans la réponse aiguë aux drogues d'abus et l'instauration de la dépendance (Wise et al., 1995), et montrent une activité diminuée après administration chronique de morphine (Diana et al., 1995). La transmission dopaminergique n'est cependant pas requise pour l'expression des symptômes somatiques et comportementaux du sevrage (Caille et al., 2003). D'autre part, les neurones noradrénergiques centraux sont essentiels 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). L'administration de composés adrénergiques comme la clonidine, agoniste des récepteurs α_2 utilisé en clinique pour soulager le syndrome

de sevrage qui accompagne la désintoxication, diminue à la fois les symptômes somatiques et comportementaux du sevrage (Caille et al., 1999), confirmant une contribution importante des voies noradrénergiques centrales à ces effets (Maldonado, 1997).

La contribution de la sérotonine (5-HT) a suscité beaucoup moins d'attention. Les neurones sérotoninergiques des noyaux du raphé qui projettent vers un grand nombre de structures méso-limbiques (striatum, amygdale, hippocampe, cortex frontal) ne sont pas requis pour l'établissement des propriétés récompensantes 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., 2003). Pourtant, une administration aigüe de morphine augmente les taux de 5-HT dans de nombreuses régions dont les noyaux du raphé, le noyau accumbens, l'hypothalamus, l'amygdale, l'hippocampe et le cortex frontal (Fadda et al., 2005; Grauer et al., 1992; Tao and Auerbach, 1995). Au cours de séances d'auto-administration de morphine, un efflux de 5-HT accompagne les premières prises au niveau du cortex cingulaire antérieur chez le rat (Sudakov et al., 2007) alors qu'une administration chronique de morphine diminue les taux de 5-HT dans plusieurs régions cérébrales suite au sevrage (Tao et al., 1998). Une stimulation de la transmission sérotoninergique est d'ailleurs capable de contrecarrer les effets aigus de la morphine. En effet, les propriétés récompensantes exagérées de la morphine chez les rats ayant été préalablement exposés à la morphine sont contrecarrées par une injection du précurseur de la sérotonine (5-HTP), ou une injection aigüe d'un inhibiteur de recapture sélectif de la sérotonine (IRSS) (Harris and Aston-Jones, 2001), qui augmentent les taux sérotoninergiques extracellulaires centraux. De plus, l'administration d'un IRSS 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 négatifs (Rafieian-Kopaei et al., 1995) du sevrage. Ainsi, sans pour autant être nécessaire à l'établissement des différents processus de dépendance, la transmission sérotoninergique peut significativement influencer ceux-ci, et sa potentialisation apparaît bénéfique pour atténuer les conséquences physiques et motivationnelles caractéristiques du sevrage.

Sérotonine et conduites émotionnelles

Les conséquences des altérations de transmission sérotoninergique décrites lors de l'instauration de la dépendance et du sevrage, ont été très peu étudiées à plus long terme. Pourtant, le rôle de la 5-HT dans la régulation des processus émotionnels (anxiété : (Griebel, 1995) et le contrôle de l'humeur (dysthymie, dépression : (Graeff et al., 1996; Lesch and Mossner, 2006) est aujourd'hui admis. La théorie mono-aminergique de la dépression (Berton and Nestler, 2006; Nutt, 2008) postule qu'une diminution chronique de l'activité des neurones sérotoninergiques du raphé (Michelsen et al., 2008), reflétée par une diminution des taux de 5-HT extracellulaire au niveau des structures cibles et une diminution des métabolites de la 5-HT dans le liquide céphalo-rachidien ou le sang, est associée aux troubles dépressifs (Ruhe et al., 2007). Les manipulations chroniques du système sérotoninergique sont de ce fait largement exploitées en thérapeutique dans les domaines de l'anxiété et de la dépression (Chen et al., 2008). En effet, une part importante des traitements des troubles de l'affect visent à stimuler de manière chronique la transmission aminergique, particulièrement sérotoninergique. L'administration chronique d'agonistes des récepteurs 5-HT_{1A} (buspirone) est préconisée pour le traitement de l'anxiété, tout comme les molécules antidépressives qui augmentent les taux de sérotonine extracellulaire. Ils agissent en inhibant sa recapture par des transporteurs sélectifs de la 5-HT (fluoxétine) ou mixte 5-HT/NA (désipramine, imipramine), soit en inhibant la dégradation des amines par la monoamine oxidase (phénelzine). Un délai d'action important (3-4 semaines) est requis pour leur efficacité, attribué à la nécessité d'une plasticité au sein du système sérotoninergique.

Évaluation expérimentale des conduites émotionnelles

Chez les rongeurs, les réponses émotionnelles associées à une condition d'anxiété sont évaluées à partir des réactions comportementales générées par une situation de conflit. En effet, l'anxiété d'état résulte d'une situation de conflit entre leur tendance à l'exploration d'un environnement nouveau et le danger représenté par celui-ci, nécessitant l'évaluation des risques potentiels de la situation nouvelle. Le dispositif du *labyrinthe en croix surélevé*, constitué de deux bras « fermés » et de 2 bras « ouverts », se fonde sur l'aversion naturelle des rongeurs pour la hauteur et les espaces non protégés. Le dispositif de la *boîte claire/obscur*, constitué d'un compartiment sombre et d'un compartiment fortement éclairé reliés ou non par un tunnel, est quant à lui basé sur l'aversion naturelle des rongeurs nocturnes

pour la lumière. Le test du *champ-ouvert* est basé sur le caractère aversif d'une zone éclairée et non protégée, au centre d'une arène. La validité de ces tests repose en partie sur leur signification biologique pour l'animal et leur sensibilité aigüe aux composés anxiolytiques de référence (Valium® par exemple), qui réduisent l'évitement des zones aversives. Le test de l'interaction sociale est un paradigme intéressant qui permet d'évaluer la réponse comportementale face à un conspécifique mâle potentiellement dangereux. Ce test permet d'évaluer les conduites anxieuses lorsque les conditions expérimentales sont aversives (éclairage, environnement nouveau) ou les comportements sociaux proprement dits en conditions peu aversives (éclairage faible, environnement connu). De plus, ce test répond à la fois à un traitement anxiolytique ou antidépresseur.

Les dispositifs expérimentaux permettant d'évaluer les comportements de résignation associés à un état émotionnel de « type dépressif » sont basés sur l'étude des réactions comportementales en confrontation à une situation stressante incontrôlable et inévitable. Le *test de la nage forcée* et de *la suspension caudale*, comme leurs noms l'indiquent, consistent à placer les animaux dans un béccher 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., 1977) puis rapidement adapté avec succès à la souris (Porsolt et al., 1977) pour évaluer les comportements de résignation (*behavioral despair*). La suspension caudale a été initialement développée chez la souris (Cryan et al., 2005). Les deux tests engagent une situation d'exposition à un stress incontrôlable de laquelle les animaux essayent vigoureusement de s'extraire pour fuir. Ceci se traduit par des comportements actifs et volontaires d'escalade des parois dans le test de la nage forcée et de débatement dans la suspension caudale, qui font place au bout de quelques minutes à des périodes d'immobilité passive. La validité de ces tests découle de leur sensibilité aux antidépresseurs efficaces en clinique, quel que soit leur spectre pharmacologique, qui diminuent significativement la durée des comportements passifs et favorisent les comportements orientés vers la fuite. Ils s'avèrent ainsi extrêmement utiles pour le criblage de propriétés antidépressives de nouvelles molécules. En raison de leur sensibilité aigüe aux antidépresseurs, qui contraste avec la durée de traitement nécessaire pour obtenir un effet thérapeutique chez l'humain, 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 aujourd'hui 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 qui promeuvent le développement d'un état pathologique chez l'homme (génétiques, stress répété). De plus un déficit dans ces tests accompagne souvent d'autres altérations physiologiques et comportementales qui font partie des symptômes de diagnostic de la dépression chez l'homme comme la variation de poids, les modifications du niveau hédonique ou la perturbation des cycles de sommeil. Ils sont de ce fait largement utilisés pour la détection d'un état émotionnel de résignation chez la souris, qui pourrait s'apparenter à un phénotype de type dépressif (*depressive-like behavior*).

Objectif de l'étude

Nous avons postulé que suite à un historique de dépendance physique à la morphine, des troubles durables des fonctions émotionnelles pourraient se développer. Au-delà des déficits motivationnels et émotionnels qui accompagnent l'expérience aversive et limitée dans le temps du sevrage physique, nous cherchons à mettre en évidence des adaptations durables des fonctions émotionnelles au cours d'une période d'abstinence prolongée. Pour ceci, une dépendance physique est instaurée par injections de doses croissantes de morphine (Matthes et al., 1996) puis le traitement est interrompu pour laisser place à un sevrage spontané et à un état d'abstinence prolongée chez la souris C57BL6J. Nous caractérisons ici les réponses émotionnelles associées à l'état d'abstinence prolongée (1 et 4 semaines). Pour ceci nous évaluons le comportement locomoteur exploratoire spontané et les comportements de type anxieux (dans un champ ouvert, une boîte claire/obscur et le test d'interaction sociale), ainsi que les comportements associés à l'état de résignation (dans les tests de nage forcée et de suspension caudale). Suite à la déplétion de 5-HT décrite au niveau des structures mésolimbiques décrite dans la littérature après une administration chronique de morphine, nous testons ensuite l'hypothèse d'une contribution sérotoninergique au développement d'un état émotionnel aberrant, en évaluant sa sensibilité à un traitement chronique préventif avec un antidépresseur IRSS de référence, la fluoxétine (Prozac®).

MATERIELS ET METHODES

1. Animaux et conditions d'hébergement

Les souris de la souche c57BL/6J proviennent des laboratoires Charles River (France) et sont livrées âgées de 8 semaines. Elles sont ensuite hébergées 2 à 3 semaines avant le début de l'expérimentation, selon les conditions standard de la plateforme de phénotypage de l'Institut Clinique de la Souris. 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 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ et le cycle d'éclairage 12h/12h constant. Trente minutes avant chaque test de comportement, les animaux sont déplacés dans une anti-chambre qui communique avec la salle d'expérience afin de permettre une habituation aux conditions expérimentales et de diminuer l'impact du stress sur l'évaluation comportementale.

2. Drogues

Le sulfate de morphine (Francopia, France) et la naloxone (Sigma, France) sont dissous dans une solution physiologique de NaCl 9‰ et sont injectés à un volume de 10 ml/kg, par voie intra-péritonéale (i.p.) et sous-cutanée (s.c.), respectivement. La fluoxétine (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 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.

3. Schéma expérimental

3.1. Induction de la dépendance (cf. schéma expérimental figure 15)

Des doses croissantes de morphine, de 20 à 100 mg/kg, sont injectées aux souris deux fois par jour, à raison d'un intervalle fixe d'environ 10 h (9 h-19 h) pendant 5 jours. La dose augmente de 20 mg/kg quotidiennement, pour atteindre 100 mg/kg le jour 5. Le jour 6, une dose unique de 100 mg/kg est administrée. Les souris du groupe contrôle sont injectées selon le même mode avec la solution saline de NaCl 9‰.

3.2. Abstinence (cf. schéma expérimental figure 15 et 16)

Expérience I

Suite à la dernière injection le jour 6, les souris injectées avec le véhicule (n=14) ou la morphine (n=14) retournent à leur hébergement habituel pour une durée de 1 (n=6 saline, n=6 morphine) ou 4 semaines (n=8 saline, n=8 morphine), et subissent un sevrage spontané (le poids et l'état général sont suivis, mais le sevrage spontané n'est pas mesuré).

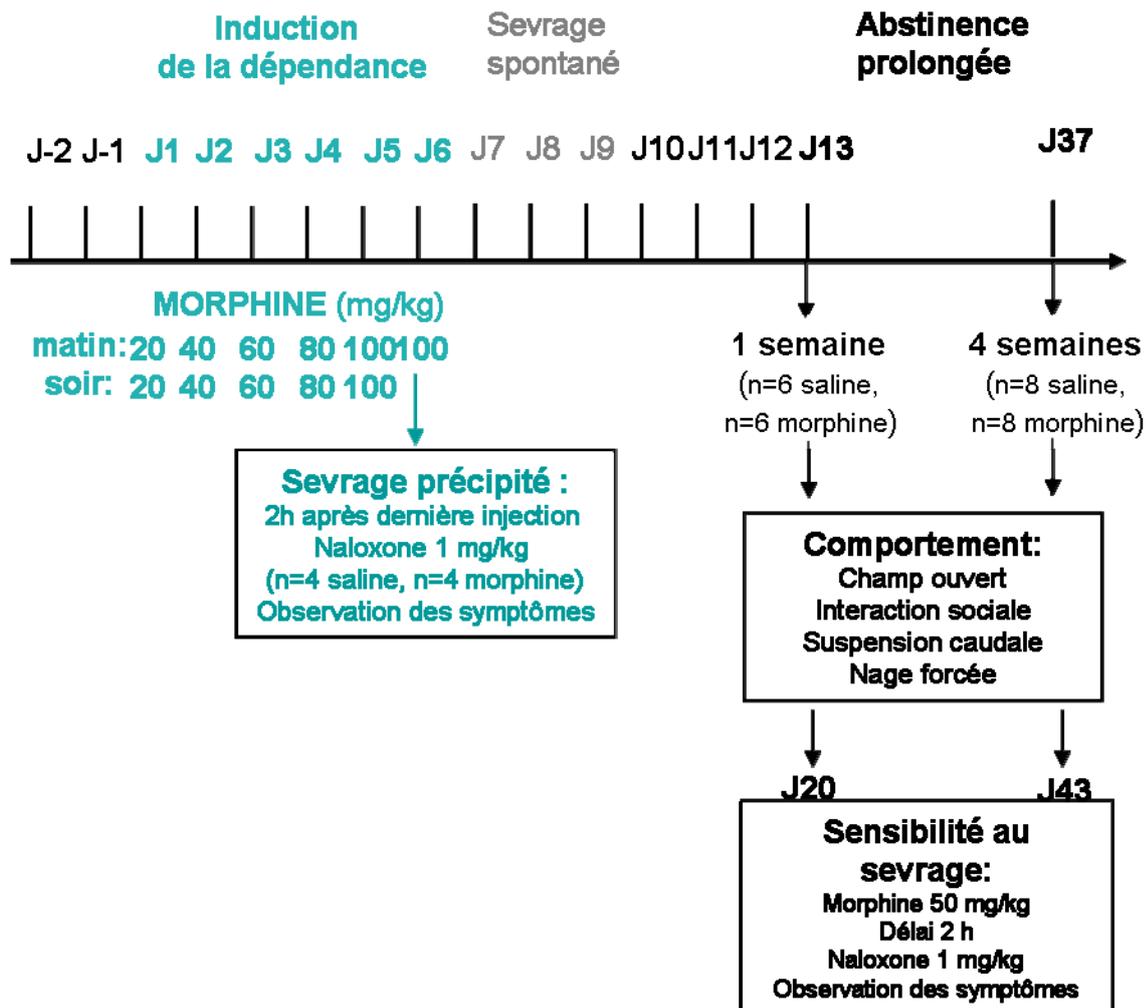


Figure 15: Schéma expérimental de l'expérience I

Effet de la durée de l'abstinence aux opiacés sur les conduites émotionnelles et sociales et la sensibilité au sevrage aigu. L'induction de la dépendance se fait par des injections sont répétées 2 fois par jour, pendant 6 jours, avec des doses croissantes (20 à 100 mg/kg) de morphine ou avec une solution saline. L'état de dépendance physique est vérifié en précipitant un sevrage par la naloxone 2 heures après la dernière injection de morphine (n=4). Les groupes de souris subissent un sevrage spontané et leur comportement émotionnel et social, ainsi que leur sensibilité au sevrage, sont évalués après une période de 1 ou 4 semaines d'abstinence.

Expérience II

Suite à la dernière injection le jour 6, les souris retournent à leur hébergement habituel pour une durée de 4 semaines. Le jour 7, les souris ayant reçu le véhicule (n=20) ou la morphine (n=20) sont réparties en 2 groupes, et la nourriture commerciale est remplacée par la nourriture « contrôle » (n=10 saline, n=10 morphine) ou la nourriture contenant 10 mg/kg de fluoxétine (n=10 saline, n=10 morphine). Cette expérience a été répétée de manière indépendante, et les N indiqués correspondent aux données des deux expériences rassemblées (n=19-20/condition).

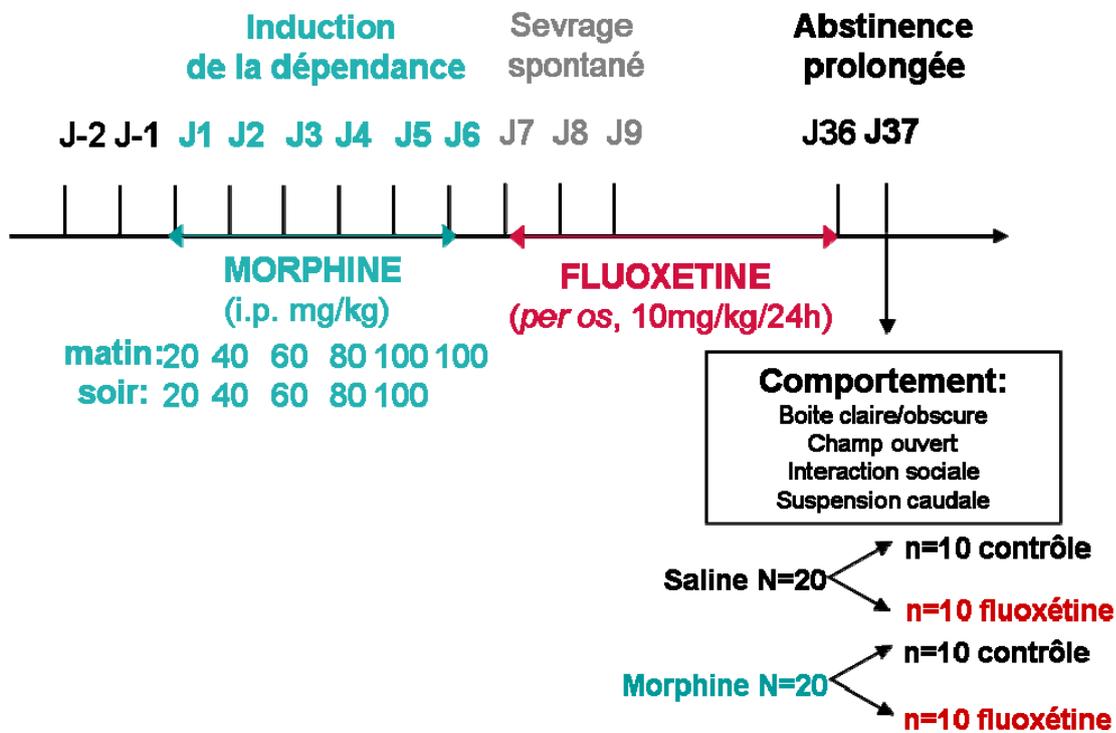


Figure 16: Schéma expérimental de l'expérience II

L'induction de la dépendance se fait par des injections répétées 2 fois par jour, pendant 6 jours (J1 à J6) par voie intra-péritonéale (i.p.), avec des doses croissantes (20 à 100 mg/kg) de morphine ou avec une solution saline. Les souris du groupe saline et morphine sont ensuite traitées avec la fluoxétine administrée de manière chronique dans la nourriture (10 mg/kg/24h), et leur comportement émotionnel et social est évalué après une période 4 semaines d'abstinence.

3.3. Sevrage précipité

Dans chacune des expériences, l'établissement de la dépendance physique suite aux injections chroniques est vérifié sur un petit groupe supplémentaire de souris (n=4 saline, n=4 morphine) par injection de naloxone (1 mg/kg) 2 h après la dernière injection de saline ou de morphine le jour 6. Les symptômes de sevrage sont quantifiés par observation au travers d'un cylindre transparent, pendant 25 minutes. Le nombre de symptômes somatiques de sevrage sont comptabilisés par tranches de 5 minutes, et totalisés sur 25 minutes. Les symptômes observés sont le saut, les secousses corporelles, le tremblement des pattes antérieures et les reniflements. La présence (notée 1) ou l'absence (notée 0) de symptômes végétatifs tels que les mouvements de mâchoire, le ptosis, ou la piloérection est également relevée. Afin d'effectuer un suivi de la susceptibilité au sevrage au cours du temps, la sensibilité à la naloxone (1 mg/kg) après une injection unique de morphine (50 mg/kg) est évaluée à 1 et 4 semaines d'abstinence (après les tests comportementaux).

4. Caractérisation comportementale de l'état d'abstinence

Dans les expériences I et II, les tests comportementaux sont effectués dans l'ordre suivant : boîte claire-obscur, champ ouvert, interaction sociale, suspension caudale et nage forcée, avec 1 jour de délai entre chacun des tests à l'exception des tests du champ ouvert et d'interaction sociale, qui sont consécutifs.

4.1. Boîte claire/obscur

Le dispositif est constitué de deux compartiments de taille identique (20x20x14 cm) reliés ou non par un tunnel opaque (5x7x10 cm) équipés de deux rangées de faisceaux infra-rouge (Immetronic, France). Le compartiment « clair » formé par des murs en PVC blanc est fortement éclairé, alors que le compartiment obscur possède des murs foncés, sans éclairage. Les animaux sont placés dans le compartiment obscur et leur activité horizontale et verticale, le nombre de transitions du compartiment éclairé vers le compartiment obscur, ainsi que le temps passé dans chacun d'eux sont mesurés automatiquement pendant 5 minutes.

4.2. 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 périphérique 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.

4.3. Interaction sociale

Deux animaux de poids similaire et de même condition expérimentale, provenant de cages d'hébergement différentes, sont placés simultanément dans une arène familière (arène du champ ouvert à laquelle ils ont été exposé 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 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, l'activité exploratoire n'étant pas mesurée.

4.4. Suspension caudale

Les souris sont suspendues par la queue à un crochet relié à un dynamomètre, dans un dispositif automatisé (MED associate). Deux seuils d'activité de débattement sont définis: un seuil inférieur en dessous duquel l'activité sera nulle et comptabilisée comme comportement d'immobilité, et un seuil supérieur au-dessus duquel l'activité sera comptabilisée comme activité intense de débattement. La latence avant la première immobilisation, et la durée de ces deux comportements sont automatiquement mesurées par périodes de 2 minutes au cours des 6 minutes de test.

4.5. Nage forcée

Chaque animal est placé dans un bécher (5L) contenant 3 litres d'eau à $23\pm 1^\circ\text{C}$. L'immobilité est caractérisée par une vitesse de déplacement quasiment nulle, une position de flottement considérée en l'absence de tout mouvement à l'exception des mouvements de pattes nécessaires au maintien de la tête hors de l'eau (Porsolt et al., 1977). La latence avant la première immobilisation et la durée d'immobilité sont mesurées par périodes de 2 minutes, pendant 6 minutes à l'aide d'un clavier éthologique (Viewpoint). À la fin du test, les animaux sont séchés et placés sous lampes chauffantes pendant 10 minutes.

5. Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés et présentés sous la forme de la moyenne \pm erreur standard. Pour la comparaison des moyennes entre deux groupes, un test de t de Student à variables non appariées est utilisé. Lorsque les mesures sont répétées dans le temps, on utilise une ANOVA à mesures répétées. L'analyse de la variance (ANOVA) à un ou deux facteurs est utilisée selon le cas, afin de comparer les effets de chaque facteur considéré et mettre en évidence d'éventuelles interactions entre facteurs. Dans l'expérience I, les facteurs analysés sont le traitement (morphine/saline) et la durée d'abstinence (1 semaine/4 semaines). Dans l'expérience II, les facteurs analysés sont les traitements morphine/saline et fluoxétine/contrôle. Lorsque l'ANOVA détecte l'effet d'un des deux facteurs et/ou une interaction entre eux, une analyse à posteriori est menée grâce au test de Fisher, pour la comparaison des moyennes inter-groupes. Toute différence est considérée comme significative pour $p < 0,05$. Les symboles * indiquent un effet de traitement morphine vs saline (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,0001$, alors que les symboles ⁺ indiquent un effet de la durée d'abstinence dans l'expérience I ou un effet du traitement fluoxétine dans l'expérience II (⁺ $p < 0,05$; ⁺⁺ $p < 0,01$; ⁺⁺⁺ $p < 0,0001$).

RESULTATS

1. Expérience I : Influence de la durée d'abstinence

1.1. Dépendance physique (figure 17)

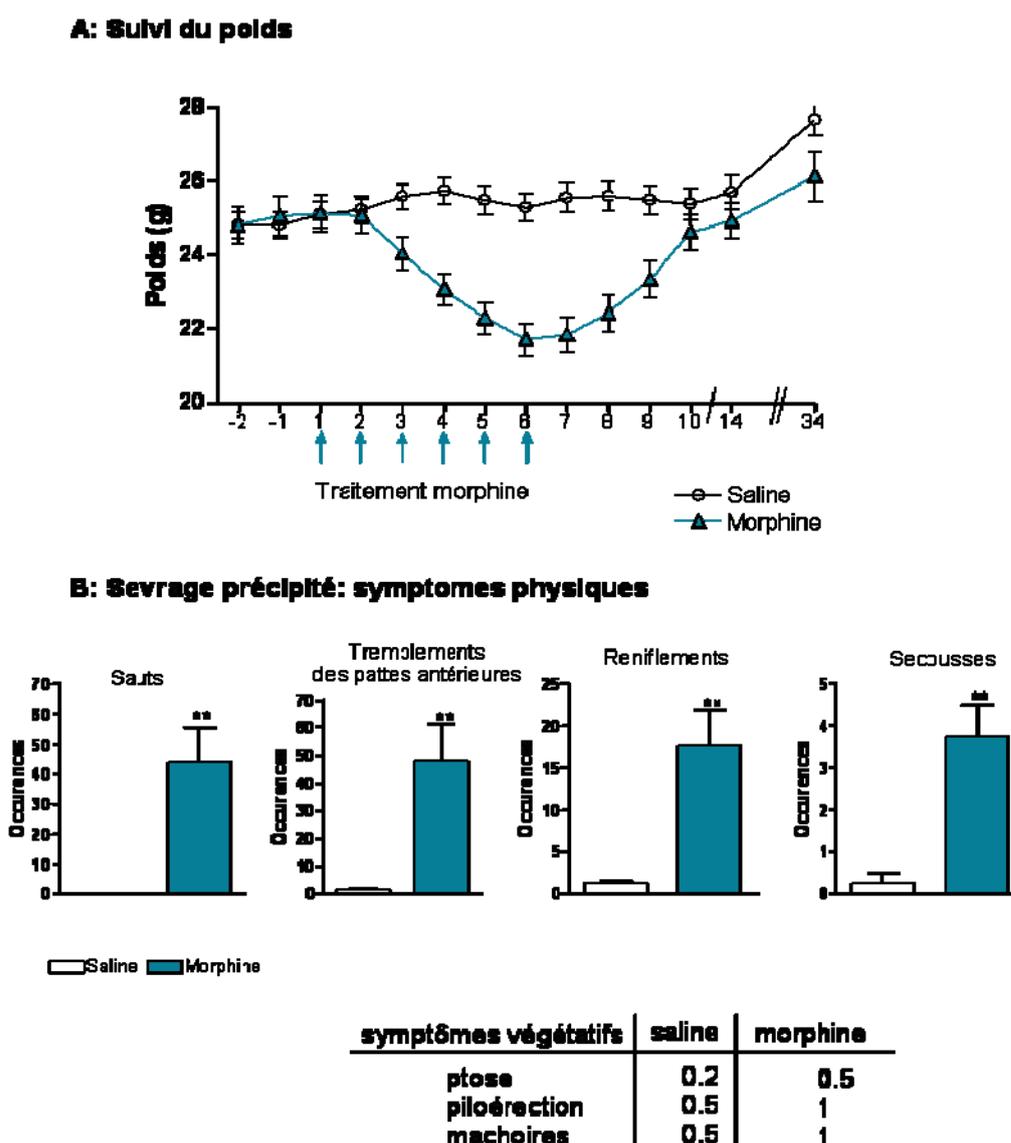


Figure 17: Evaluation de la dépendance physique

(A) Evolution du poids des groupes injectés 2 fois par jour, pendant 6 jours, avec des doses ascendantes de morphine (20 à 100 mg/kg), ou de solution saline selon le protocole d'induction de la dépendance. (n=14 par groupe). (B) Symptômes de dépendance physique observés suite au sevrage pharmacologique précipité par une injection de naloxone (1mg/kg) 2 heures après la dernière injection de morphine. (n=4 par groupe), * p<0.05 et ** p<0.01 test de t non apparié.

L'induction de la dépendance physique au cours des 6 jours d'injection de morphine est suivie grâce à l'évolution du poids et la précipitation d'un syndrome de sevrage par la naloxone. La figure 17A représente l'évolution du poids moyen des groupes de souris ayant été exposés à la morphine (N=18 soit N=14 +4 sevrage) ou à la solution saline (N=18), des jours précédant les injections (J-2) jusqu'au début des tests comportementaux au jour 14 (1 semaine d'abstinence) ou au jour 34 (4 semaines d'abstinence). Les souris du groupe traité avec la morphine perdent jusqu'à 13% de leur poids au jour 6, et récupèrent progressivement jusqu'au jour 10, mais leur poids demeure légèrement inférieur à celui du groupe injecté avec le véhicule, à 1 et 4 semaines d'abstinence. La précipitation des symptômes de sevrage par la naloxone, 2h après la dernière injection (N=4 saline, N=4 morphine), révèle l'apparition de symptômes somatiques de sevrage. La comparaison des moyennes des groupes saline et morphine (test de t de student) indique une augmentation significative du nombre de sauts ($p<0,01$), de tremblements des pattes antérieures ($p<0,01$), de reniflements ($p<0,01$) et de secousses corporelles ($p<0,01$) pour le groupe morphine. A noter également la présence plus importante de symptômes végétatifs pour le groupe morphine.

1.2. Champ ouvert : activité locomotrice et anxiété (figure 18)

L'influence de la durée d'abstinence suivant un traitement chronique à la morphine sur le comportement exploratoire et le niveau d'anxiété basale est représentée figure 18. Ni le traitement morphine, ni la durée d'abstinence n'affectent significativement la distance parcourue dans le champ ouvert ([effet morphine : $F(1,28)=0.1$; $p>0,05$] et durée d'abstinence [$F(1,28)=0.8$; $p>0,05$]). L'analyse du temps passé au centre du champ ouvert indique que la morphine ne modifie pas les comportements d'anxiété [$F(1,28)=2,2$; $p>0,05$], mais détecte un effet significatif de la durée d'abstinence [$F(1,28)=31$; $p<0,0001$], les animaux passant significativement plus de temps au centre après 4 semaines d'abstinence ($p<0,01$ dans les deux cas).

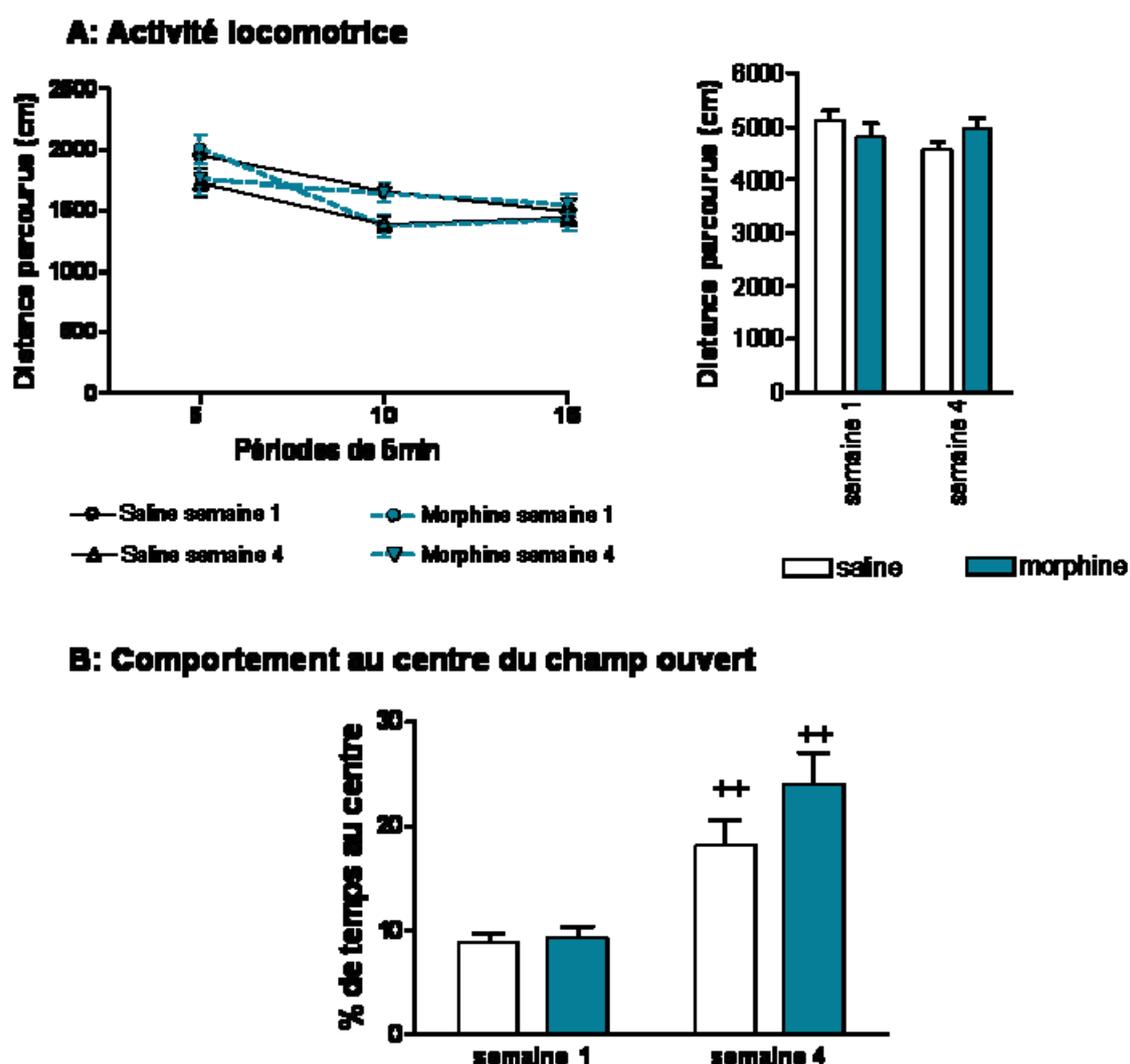


Figure 18: Influence de la durée d'abstinence sur l'activité locomotrice et les comportements anxieux évalués dans un champ ouvert. (A) Activité locomotrice dans le champ ouvert évaluée pendant 15 minutes après 1 semaine ou 4 semaines d'abstinence suite au traitement chronique avec la morphine, par tranches de 5 minutes (à gauche) et en distance totale parcourue (à droite). (B) Pourcentage de temps passé dans la zone centrale du champ ouvert, après 1 semaine ou 4 semaines d'abstinence morphinique, mesuré pendant les 15 premières minutes du test. Les résultats représentent la moyenne \pm s.e.m. et ++ $p < 0.01$ indique une différence significative entre 1 et 4 semaines, pour le groupe ayant reçu le même traitement.

1.3. Interaction sociale (figure 19)

La Figure 3A représente l'effet d'une exposition préalable chronique à la morphine sur les comportements sociaux, après 1 ou 4 semaines d'abstinence. L'analyse de la variance détecte un effet significatif du traitement [$F(1,16)=9$; $p<0,01$] mais non de la durée d'abstinence [$F(1,16)=0,1$; $p>0,05$], et la comparaison inter-groupe indique une diminution significative du temps passé à investiguer le partenaire au sein du groupe morphine, à 4 semaines d'abstinence uniquement ($p<0,01$). La figure 19B représente l'effet d'une exposition chronique préalable à la morphine sur les comportements individuels à 4 semaines d'abstinence. La comparaison des moyennes entre groupe morphine et saline (test de t) indique une augmentation significative du temps passé à effectuer des comportements individuels de toilettage ($p<0,05$).

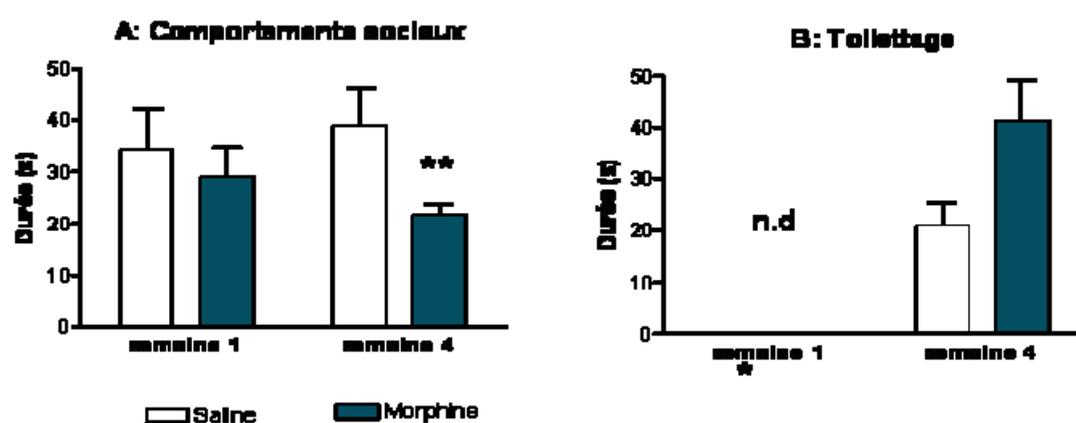


Figure 19: Influence de la durée d'abstinence sur les comportements sociaux lors du test d'interaction sociale. L'interaction sociale est évaluée par observation éthologique d'un couple d'animaux ayant reçu le même traitement, dans le champ ouvert faiblement éclairé, familier. (A) Effet des différents traitements sur le temps passé à investiguer le partenaire (poursuite, reniflements). (B) Effet du traitement chronique avec la morphine sur la durée d'exécution du comportement de toilettage par chacun des deux sujets de manière individuelle (non déterminé à une semaine). Les résultats représentent la moyenne \pm s.e.m. et * $p<0,05$ ou ** $p<0,01$ indique un effet significatif du traitement morphine.

1.4. Suspension caudale (figure 20)

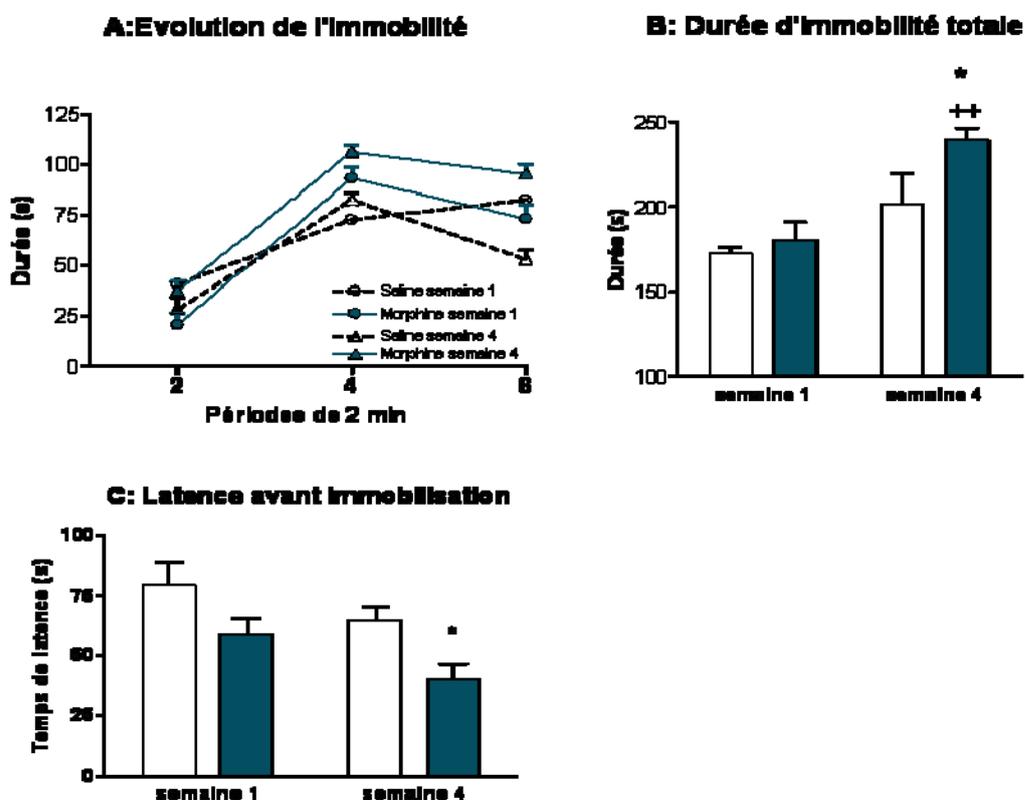


Figure 20: Influence de la durée d'abstinence sur les comportements de résignation évalués dans le test de la suspension caudale. Les souris abstinentes sont suspendues par la queue et la durée d'immobilité et la latence de première immobilisation sont automatiquement mesurés. (A) Evolution de l'immobilité par périodes de 2 minutes et (B) durée d'immobilité totale au cours des 6 minutes de suspension caudale, après 1 semaine et 4 semaines d'abstinence morphinique. (C) Temps de latence avant la première immobilisation. * $p < 0,05$ indique un effet significatif du traitement morphine vs saline au temps correspondant et ++ $p < 0,01$ indique une différence par rapport au groupe morphine à 1 semaine d'abstinence.

La figure 20A décrit l'évolution du comportement d'immobilité par périodes de 2 minutes au cours des 6 minutes de suspension caudale. L'analyse statistique réalisée sur la durée totale d'immobilité révèle un effet significatif du traitement [$F(1,28)=4,4$; $p < 0,05$] et de la durée d'abstinence [$F(1,28)=16,4$; $p < 0,01$] (figure 20B). Le groupe morphine, abstinente depuis 4 semaines, s'immobilise significativement plus que le groupe saline au même temps ($p < 0,05$), et significativement plus que le groupe morphine testé à 1 semaine d'abstinence ($p < 0,01$). De plus la latence de première immobilisation est également affectée par le traitement morphine

[F(1,24)=9,6; $p<0,01$] mais non par la durée d'abstinence [F(1,24)=3,3; $p>0,05$]. En effet, les souris du groupe morphine s'immobilisent plus rapidement ($p=0,054$ à 1 semaine et $p<0,05$ à 4 semaines).

1.5. Nage forcée (figure 21)

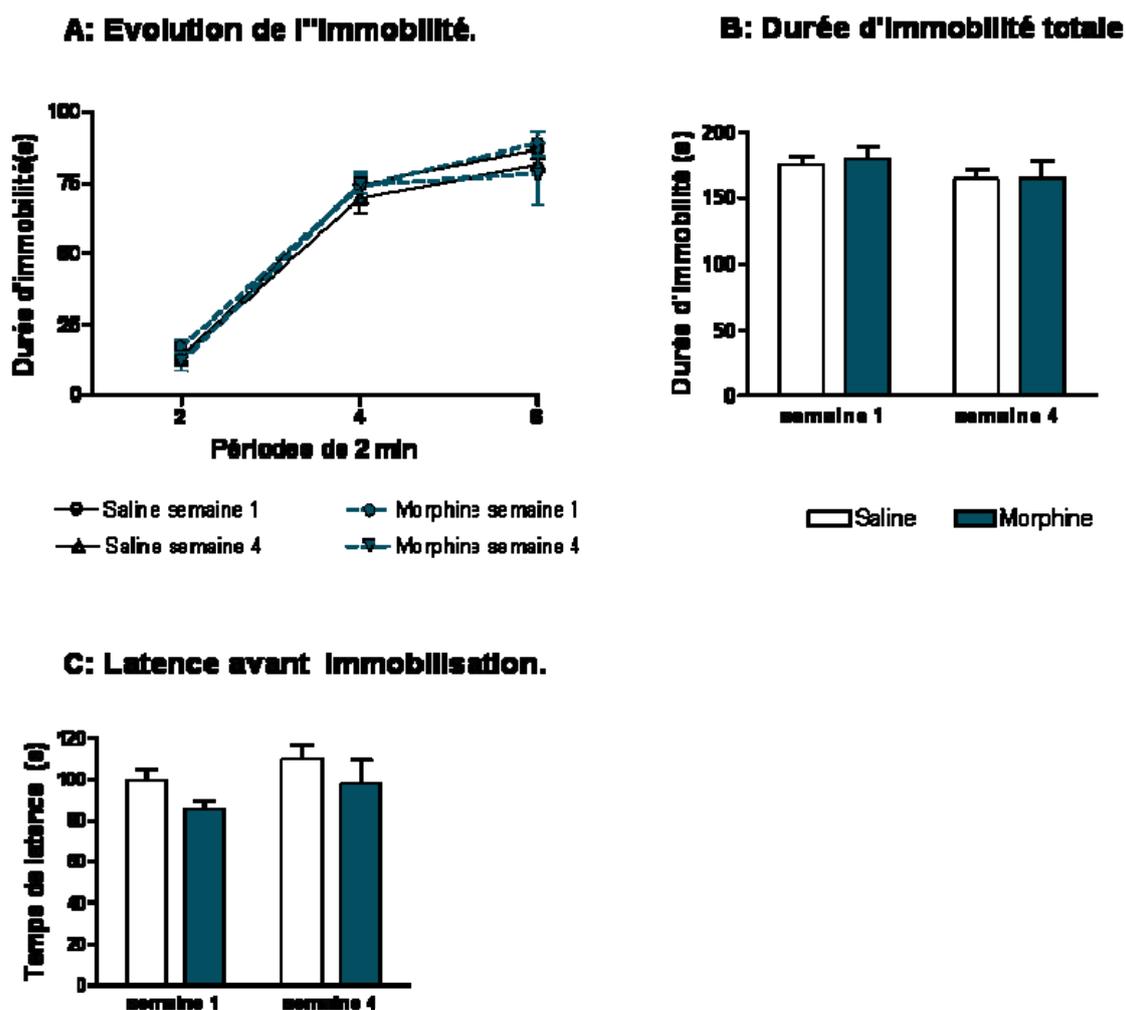


Figure 21: Influence de la durée d'abstinence sur les comportements de résignation évalués dans le test de la nage forcée. Les souris sont placées dans un b cher rempli d'eau à 23 C et la durée d'immobilité est  valu e par périodes de 2 minutes pendant 6 minutes. Après 1 semaine ou 4 semaines d'abstinence morphinique. (A) Evolution de la durée d'immobilité par périodes de 2 minutes au cours des 6 minutes de test. (B) Durée d'immobilité(s) totale. (C) Temps de latence (s) avant la première immobilisation.

L'influence de la durée d'abstinence suivant un traitement chronique à la morphine sur le comportement passif de flottement (immobilité) dans le test de nage forcée est représentée figure 21. La figure 21A montre l'évolution du flottement par périodes de 2 minutes au cours des 6 minutes de test. Ni le traitement [$F(1,28)=0,1$; $p>0,05$], ni la durée d'abstinence [$F(1,28)=2$; $p>0,05$] n'influencent significativement la durée totale d'immobilité (figure 21B). La latence de première immobilisation n'est pas non plus globalement modifiée par le traitement [$F(1,28)=3$; $p>0,05$] ou la durée d'abstinence [$F(1,28)=2,4$; $p>0,05$], mais on notera que le traitement morphine tend à diminuer la latence d'immobilisation ($p=0,09$).

1.6. Sensibilité au sevrage précipité aigu (Figure 22)

La figure 22 montre l'influence d'une exposition antérieure répétée à la morphine sur l'efficacité d'une faible dose de naloxone à précipiter un sevrage aigu.

Saut

L'analyse de variance à deux facteurs indique un effet significatif du traitement [$F(1,20)=26$; $p<0,0001$] et du temps [$F(1,20)=26$; $p<0,0001$] sur les symptômes de sevrage de saut, ainsi qu'une interaction significative entre ces 2 facteurs ($p<0,0001$). L'analyse post-hoc indique que les souris abstinentes à la morphine sont plus sensibles à la naloxone que les souris du groupe saline ($p<0,0001$) suite à une réexposition aiguë à la morphine au jour 20 (1 semaine d'abstinence + 1 semaine de tests, cf. schéma expérimental figure 15). Les pointillés servent de repère pour comparaison avec la sensibilité à la naloxone 2 h après le traitement chronique (cf. figure 22).

Tremblements des pattes antérieures

L'analyse de la variance à deux facteurs indique un effet significatif du traitement [$F(1,20)=18$; $p<0,01$] et du temps [$F(1,20)=5,6$; $p<0,05$] sur le tremblement des pattes antérieures, ainsi qu'une interaction significative entre ces 2 facteurs ($p<0,05$). L'analyse post-hoc indique que les souris abstinentes à la morphine sont plus sensibles à la naloxone que les souris du groupe saline au jour 20 ($p<0,01$) et 47 ($p<0,05$).

Reniflements

L'analyse de variance à deux facteurs indique un effet significatif du traitement morphine [$F(1,20)=5,5$; $p<0,05$] sur le paramètre de reniflement. L'analyse post-hoc permet de montrer

que les souris abstinentes à la morphine sont plus sensibles à la naloxone que les souris du groupe saline au jour 20 ($p < 0,05$).

Secousses corporelles

L'analyse de la variance à deux facteurs permet de détecter un effet significatif du traitement [$F(1,20)=28$; $p < 0,0001$] sur les secousses corporelles. L'analyse post-hoc indique que les souris abstinentes à la morphine sont plus sensibles à la naloxone que les souris du groupe saline au jour 20 ($p < 0,01$) et 47 ($p < 0,01$).

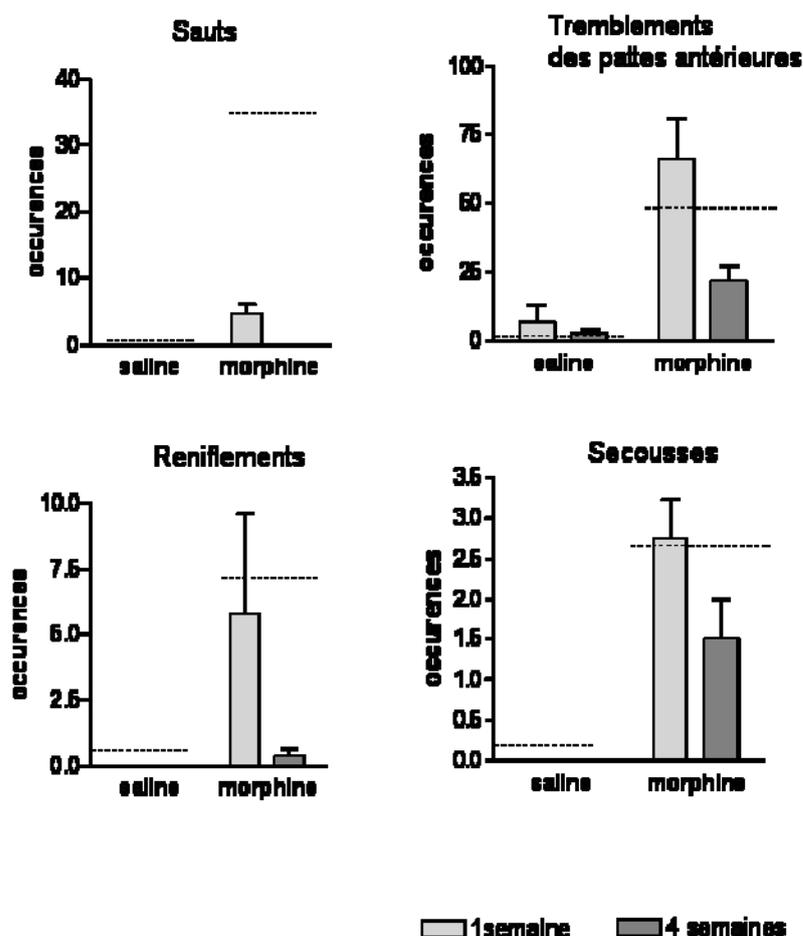
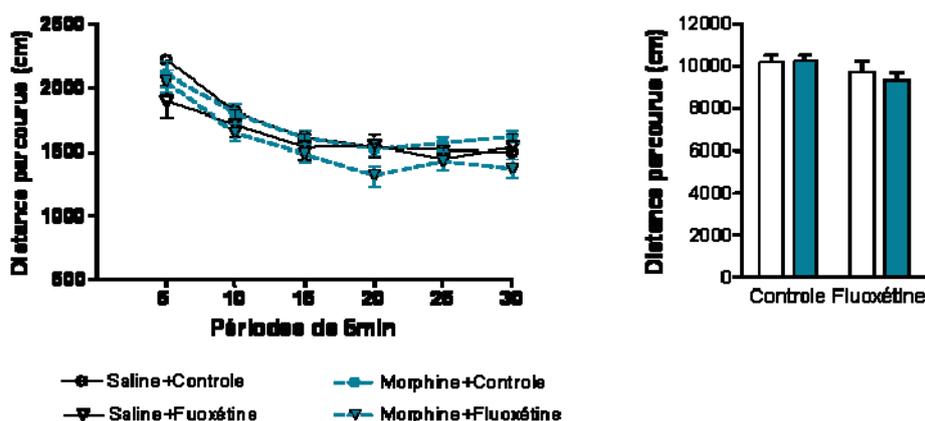


Figure 22: Influence de la durée d'abstinence sur la sensibilité à la naloxone suite à une injection aiguë de morphine. Evolution des symptômes physiques de sevrage précipité « aigu » à 1 semaine et 4 semaines d'abstinence. La sensibilité à la naloxone (1 mg/kg, s.c.), est évaluée en terme de sauts, tremblements des pattes antérieures, de reniflements et de secousses 2 heures après une injection unique de morphine (50 mg/kg, i.p). Pour comparaison, l'occurrence des symptômes de sevrage 2h après la dernière injection de morphine lors de l'induction de la dépendance (immédiat) est représentée en pointillés. * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$ indiquent un effet significatif du traitement chronique avec la morphine, par rapport au traitement saline à la durée d'abstinence correspondante ($n=10$ par groupe).

2. Expérience II : Influence de la fluoxétine sur le syndrome d'abstinence

2.1. Champ ouvert : activité locomotrice et anxiété (figure 23)

A: Activité locomotrice



B: Comportements anxieux

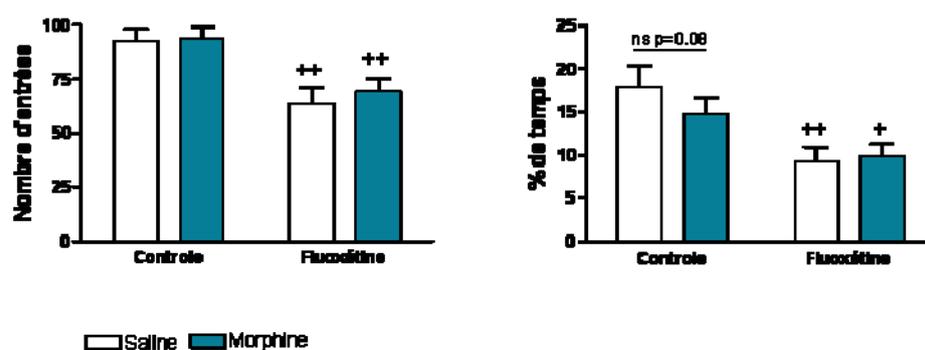


Figure 23: Influence du traitement chronique avec la fluoxétine sur l'activité locomotrice et les comportements anxieux évalués dans un champ ouvert. (A) Effets des différents traitements sur la distance parcourue (cm) pendant 30 minutes dans le champ ouvert: par tranches de 5 minutes (à gauche) et en distance totale (à droite). (B) Effet des différents traitements sur le nombre d'entrées (à gauche) et le pourcentage de temps passé dans la zone centrale du champ ouvert (à droite) pendant les 15 premières minutes du test. Les résultats représentent la moyenne \pm s.e.m pour $n=20$ par groupe, et $+p<0,05$, $++p<0,01$ indique une différence significative du traitement fluoxétine par rapport au groupe contrôle correspondant.

La figure 23 représente l'effet du traitement chronique avec la fluoxétine au cours des 4 semaines d'abstinence suivant une exposition répétée à la morphine, sur les comportements d'exploration et d'anxiété. La figure 23A montre les niveaux d'activité locomotrice pendant les 30 minutes d'exploration de l'arène du champ ouvert. L'analyse de la variance de l'activité en mesures répétées par périodes de 5 minutes (à gauche), détecte un effet du temps, indiquant une diminution significative au fur et à mesure des périodes de 5 minutes [$F(5,370)=94,2$; $p<0,0001$]. L'ANOVA à deux facteurs indique qu'il n'y a aucun effet des traitements, ni par la morphine ($[F(1,74)=0,2$; $p>0,05$]) ni par la fluoxétine [$F(1,74)=3,3$; $p>0,05$] sur la distance totale parcourue au cours des 30 minutes de test (à droite). L'analyse du comportement au centre du champ ouvert, figure 23B indique que la condition d'abstinence à la morphine ne modifie pas significativement le comportement au centre du champ ouvert (à gauche : nombre d'entrées dans la zone centrale [$F(1,74)=0,3$; $p>0,05$] et à droite : pourcentage de temps passé au centre au cours des 15 premières minutes [$F(1,74)=0,4$; $p>0,05$]) mais un effet significatif du traitement fluoxétine est détecté (nombre d'entrées [$F(1,74)=17,3$; $p<0,0001$] et pourcentage de temps au centre [$F(1,74)=11,3$; $p<0,01$]). L'analyse à posteriori confirme un effet de la fluoxétine sur le nombre d'entrées ainsi que le % de temps passé dans la zone centrale pour les groupes saline ($p<0,01$ et $p<0,01$ respectivement) et morphine ($p<0,05$ et $p<0,01$ respectivement).

2.2. Boîte claire/obscur (figure 24)

La Figure 24 représente l'effet du traitement chronique avec la fluoxétine au cours des 4 semaines d'abstinence qui suivent une exposition répétée à la morphine, sur les comportements de type anxieux dans le test de la boîte claire/obscur. L'analyse de la variance ne détecte pas d'effet de la condition d'abstinence à la morphine sur le pourcentage de temps passé du côté clair ni sur le nombre de transitions d'un compartiment à l'autre ($[F(1,36)=0,9$; $p>0,05$] et [$F(1,36)=1,2$; $p>0,05$] respectivement), mais un effet global du traitement chronique par la fluoxétine sur ces deux paramètres ($[F(1,36)=6,8$; $p<0,05$] et [$F(1,36)=7,1$; $p<0,05$]). L'analyse à posteriori confirme un effet significatif du traitement par la fluoxétine chez les souris abstinentes ($p<0,05$) sur le pourcentage de temps passé au centre du champ ouvert, et un effet significatif chez les souris du groupe saline sur le nombre de transitions ($p<0,05$).

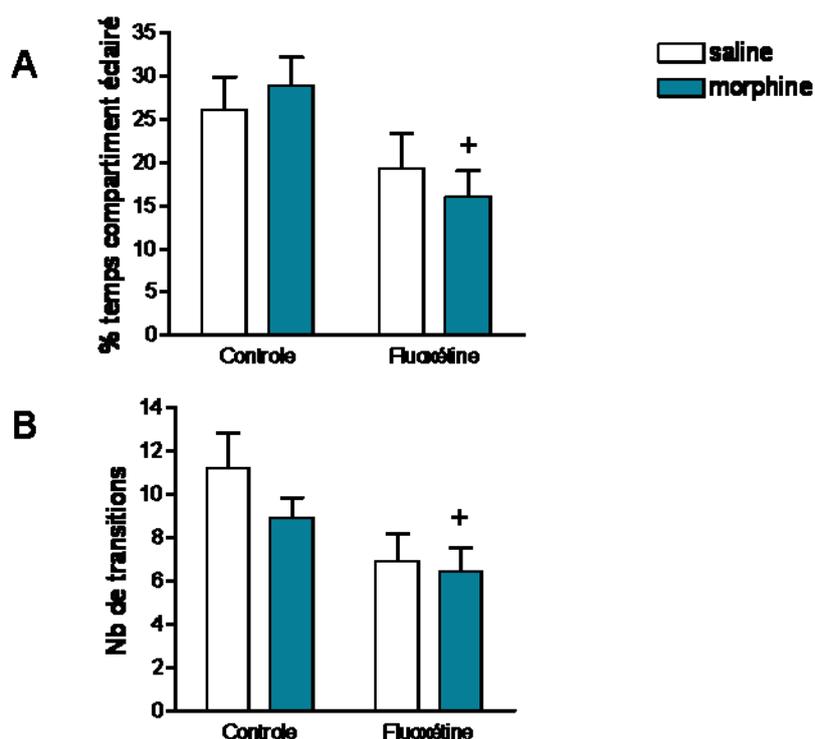


Figure 24: Influence du traitement chronique avec la fluoxétine sur les comportements anxieux évalués dans le test de la boîte claire/obscur. (A) Effet des différents traitements sur le pourcentage de temps passé du côté éclairé. (B) Effet des différents traitements sur le nombre de transitions du compartiment obscur vers le compartiment éclairé. Les résultats représentent la moyenne \pm s.e.m. pour $n=20$ par groupe et $+p<0,05$ indique une différence significative du traitement fluoxétine par rapport au groupe contrôle correspondant.

2.3. Interaction sociale (figure 25)

La figure 25 représente l'effet du traitement chronique avec la fluoxétine au cours des 4 semaines d'abstinence qui suivent une exposition répétée à la morphine, sur les comportements sociaux et individuels. L'analyse de la variance détecte un effet significatif du traitement morphine [$F(1,35)=5,5$; $p<0,05$] et du traitement fluoxétine [$F(1,35)=5,8$; $p<0,05$], ainsi qu'une interaction entre morphine et fluoxétine [$F(1,35)=4,4$; $p<0,05$] sur les comportements sociaux (figure 25A). La comparaison des moyennes inter-groupes de Fisher indique une diminution significative du temps passé à s'intéresser au partenaire mis en présence au sein du groupe morphine-contrôle par rapport au groupe saline-contrôle ($p<0,01$), et cette différence est reversée par le traitement avec la fluoxétine ($p>0,05$). Le groupe

morphine-fluoxétine passe significativement plus de temps à effectuer des comportements sociaux que le groupe morphine-contrôle ($p < 0,01$). Le temps consacré à l'exécution des séquences de toilettage individuel, représenté figure 25B, est affecté uniquement par le traitement morphine (morphine : $[F(1,35)=12,5; p < 0,01]$ et non par la fluoxétine : $[F(1,35)=0,8; p > 0,05]$). La comparaison des moyennes entre groupes indique une augmentation de la durée de toilettage individuel du groupe morphine par rapport au groupe saline, dans la condition contrôle ($p < 0,01$). Traité avec la fluoxétine, le groupe morphine n'est pas différent du groupe saline. Cependant, aucune différence significative n'est détectée entre les groupes morphine-contrôle et morphine-fluoxétine, indiquant que la fluoxétine ne contrebalance pas intégralement les effets de la morphine pour ce paramètre.

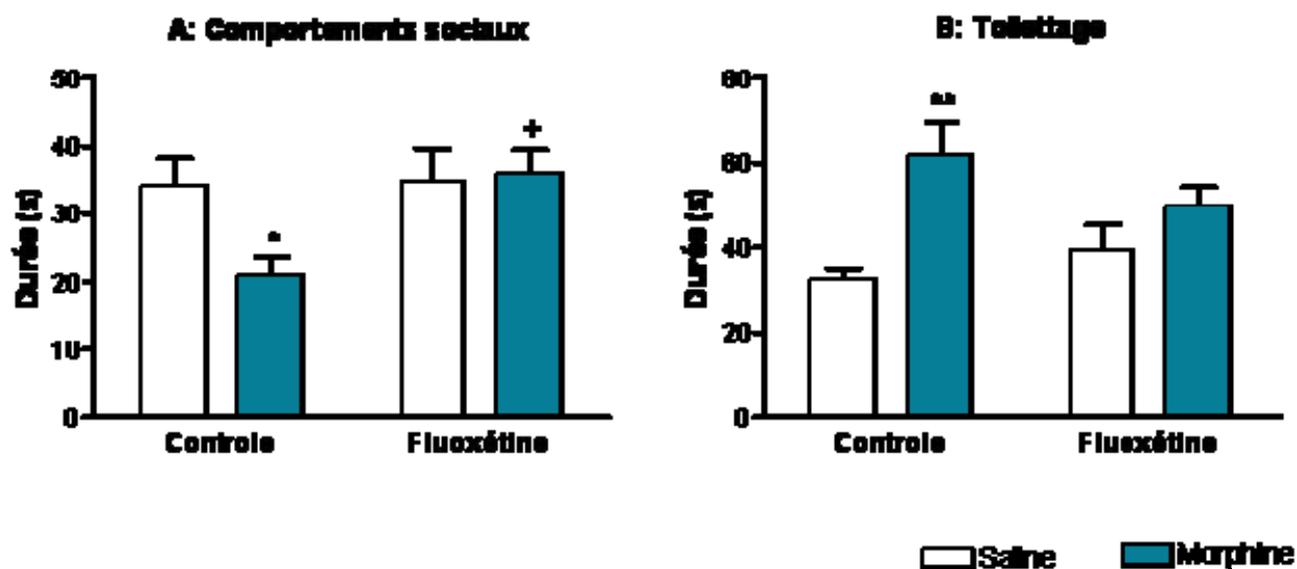
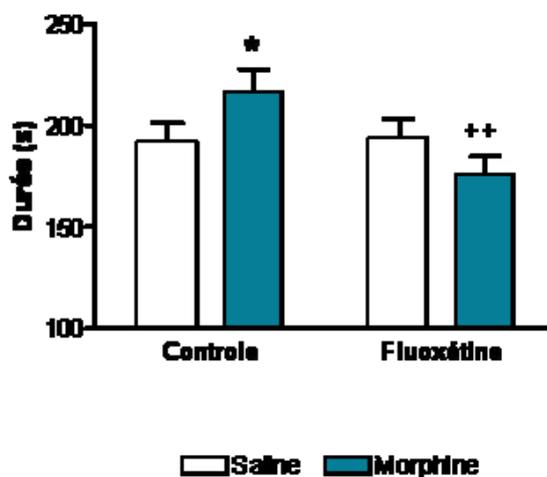


Figure 25: Influence du traitement fluoxétine sur les comportements sociaux évalués dans le test d'interaction sociale. L'interaction sociale est évaluée par observation éthologique d'un couple d'animaux issus du même groupe, dans un champ ouvert familier. (A) Effet des différents traitements sur le temps passé à investiguer le partenaire (poursuite, reniflements) (B) Effet des différents traitements sur la durée d'exécution du comportement de toilettage par chacun des deux sujets de manière individuelle. Les résultats représentent la moyenne \pm sem pour $n=20$ par groupe et * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$ indique une différence du groupe traité avec la morphine par rapport au groupe traité avec la solution saline et + $p < 0,05$ indique une différence significative du traitement fluoxétine par rapport au groupe contrôle correspondant.

2.4. Suspension caudale (figure 26)

La figure 26 représente l'effet du traitement chronique avec la fluoxétine au cours des 4 semaines d'abstinence suivant une exposition répétée à la morphine, sur les comportements de résignation (immobilité) dans le test de suspension caudale. L'analyse de la variance réalisée sur la durée totale d'immobilité (figure 26A, droite) ne détecte pas l'effet global du traitement avec la morphine [$F(1,74)=0,1$; $p>0,05$] mais celui du traitement fluoxétine [$F(1,74)=3,9$; $p<0,05$]. Surtout, une interaction est révélée entre les deux traitements ($p<0,05$), indiquant que le traitement avec la fluoxétine s'oppose aux effets de la morphine. Suite à l'analyse à posteriori, le groupe abstinent depuis 4 semaines s'immobilise plus que le groupe saline ($p<0,05$) dans la condition contrôle, et cette différence est perdue suite au traitement fluoxétine ($p>0,05$). Le groupe morphine traité avec la fluoxétine s'immobilise donc moins que le groupe morphine en condition contrôle ($p<0,01$). La latence de première immobilisation (figure 26B), n'est pas affectée par le traitement avec la morphine [$F(1,74)=1,8$; $p>0,05$], mais par le traitement par la fluoxétine [$F(1,74)=8,9$; $p<0,01$] et une interaction significative entre traitements est détectée [$F(1,74)=5,5$; $p<0,05$]. Le test post-hoc de Fisher indique que la latence du groupe morphine est significativement diminuée en comparaison au groupe saline ($p<0,01$) dans la condition contrôle et que cette différence est perdue dans la condition fluoxétine ($p>0,05$). Le groupe morphine-contrôle s'immobilise donc plus rapidement que le groupe morphine-fluoxétine ($p<0,01$).

A: Durée d'immobilité



B: Latence avant Immobilisation

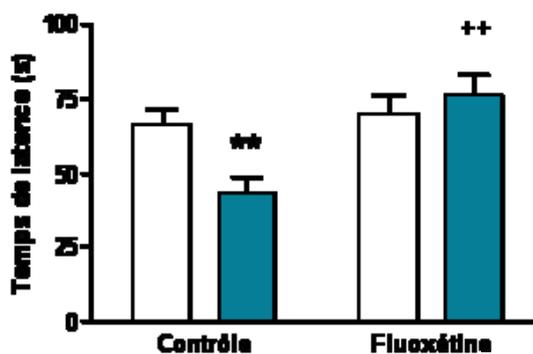


Figure 26: Influence du traitement fluoxétine sur les comportements de résignation évalués dans le test de la suspension caudale. (A) Effet des différents traitements sur la durée d'immobilité totale au cours des 6 minutes de suspension caudale. (B) Effets des différents traitements sur la latence de première immobilisation. Les résultats représentent la moyenne \pm s.e.m. pour $n=20$ par groupe. * $p<0,05$ et $p<0,01$ indiquent un effet significatif du traitement morphine vs. saline, et ++ $p<0,01$ indiquent une différence significative du traitement fluoxétine par rapport au groupe contrôle correspondant.

DISCUSSION

Le but premier de ce travail était de mettre en évidence un syndrome d'abstinence prolongé chez des sujets abstinents à la morphine, en portant un intérêt particulier aux modifications de l'affect évaluées en termes de déficits comportementaux, de type anxieux et de type dépressifs.

1. Induction de la dépendance et sevrage

L'activation aigue du récepteur mu aux opioïdes par la morphine induit un ensemble d'effets chez la souris, dont une analgésie, un réflexe de redressement de la queue (*Straub tail*) et une stimulation de la locomotion qui dure plusieurs heures. Lors de l'établissement de la dépendance par des injections répétées de morphine, l'observation de ce phénotype permet de s'assurer que la morphine a été correctement administrée. La perte progressive de poids au cours de l'induction de la dépendance est classiquement observée suite aux d'injections biquotidiennes intermittentes de doses croissantes de morphine (el-Kadi and Sharif, 1994; Kest et al., 2001). En accord avec nos données, une perte de poids de l'ordre de 15% est décrite suite à un régime d'injection identique chez la souris C57BL6J (Papaleo and Contarino, 2006). Cette diminution peut être en partie attribuée à une activation de l'axe corticotrope et à une réduction de la prise alimentaire (Houshyar et al., 2003) ou à une dépense énergétique supérieure en raison de la stimulation biquotidienne de l'activité locomotrice par la morphine pendant plusieurs heures. L'apparition ici d'un syndrome de sevrage (sauts, tremblements des pattes antérieures, reniflements, secousses corporelles, piloérection, ptose et mouvements de mâchoire, figure 17) suite au blocage de la transmission opioïdérique témoigne que notre protocole induit bien une dépendance physique (Kest et al., 2001). Des symptômes de sevrage physique spontanés apparaissent suite à l'interruption de l'administration chronique de morphine suivant le régime d'injection en doses ascendantes (20 à 100 mg/kg) et durent jusqu'à 56h après la dernière injection de morphine (2,5 jours) chez la souris C57BL6J (Papaleo and Contarino, 2006). Des modifications des cycles circadiens ont également été rapportées, en particulier une activité qui reste constante en phase diurne, et une perturbation des cycles de sommeil qui persiste jusqu'à 3 jours chez le rat (Stinus et al., 1998). Ainsi, suite à l'induction de la dépendance puis à l'interruption de l'administration de morphine, il est probable que des symptômes de sevrage spontané persistent jusqu'à 3 jours dans nos conditions.

Suivi de la susceptibilité au sevrage aigu au cours de la période d'abstinence

La sévérité de la dépendance physique à 1 et 4 semaines d'abstinence est évaluée par la sensibilité à la naloxone (1 mg/kg) suite à une injection unique de morphine (50 mg/kg). Les souris ayant été précédemment exposées aux injections chroniques du véhicule développent de rares symptômes somatiques de sevrage (cf. figure 22) dans nos conditions. L'intensité des symptômes de sevrage (spontané ou précipité), particulièrement le saut, est positivement corrélée à la dose et la durée d'exposition préalable à la morphine et reflèterait ainsi la sévérité de la dépendance. L'absence de sevrage précipité *aigu* au sein du groupe saline pourrait ici s'expliquer par la dose de naloxone insuffisante dans nos conditions (Kest et al., 2001; Walker and Sterious, 2005). En contrepartie, cette dose est suffisante pour déclencher des symptômes de sevrage chez le groupe abstinente à 1 et 4 semaines. Cette sensibilité accrue à la naloxone révèle un phénomène de sensibilisation lors de l'état d'abstinence, qui pourrait témoigner d'une susceptibilité plus importante à la (ré)instauration d'une dépendance physique suite à un amorçage par une injection de morphine. Il n'est pas possible d'exclure que l'injection de morphine (i.p.) serve de stimulus conditionné et facilite le sevrage pour le groupe morphine (Schulteis et al., 2005), mais la différence observée suggère un état latent et prolongé de dépendance physique qui peut être suivi au cours de l'abstinence. Celui-ci semble s'atténuer dans le temps et il serait utile de déterminer une période critique, pendant laquelle ces différences de susceptibilité au sevrage seraient maintenues, en prolongeant la durée d'abstinence testée.

2. Développement d'un « état d'abstinence ».

La distinction entre sevrage et abstinence est mal définie et principalement fonction d'une limite temporelle. Le sevrage proprement dit décrit la période associée à la symptomatologie accompagnant la désintoxication suite à l'arrêt de l'administration de morphine et durerait approximativement 3 jours dans nos conditions (Papaleo and Contarino, 2006). La transition à l'abstinence, en situation de sevrage spontané, se fait de manière progressive en fonction du temps. L'état affectif qui accompagne le sevrage physique est habituellement évalué par les comportements d'évitement du contexte associé au sevrage (conditionnement d'aversion de place) ou les comportements associés à un état anxieux (Castilho et al., 2008; Harris and Aston-Jones, 1993; Harris and Aston-Jones, 2001; Schulteis et al., 1998). Toutefois, l'augmentation des niveaux d'anxiété et les dysfonctionnements émotionnels décrits au cours

de la période de sevrage apparaissent également dans une situation de « sevrage aigu », consécutif à une injection unique de morphine (Azar et al., 2003; Liu and Schulteis, 2004). Les modifications de l'état affectif et motivationnel rapportées pendant l'expérience aversive du sevrage physique pourraient de ce fait refléter plus généralement des réponses compensatoires aiguës en conséquence du blocage de la transmission opioïdérique. Par contre, l'altération des fonctions hédoniques et motivationnelles est décrite comme persistante dans des modèles de conditionnement de place à la morphine ou d'aversion de place à la naloxone (Harris and Aston-Jones, 2003; Mueller et al., 2002; Stinus et al., 2000), et pourrait même s'accroître dans le temps (Sakoori and Murphy, 2005; White et al., 2005) suggérant que des mécanismes d'adaptation à la morphine se développent au long cours. Intéressés par les conséquences d'une adaptation à long terme suite à une exposition chronique aux drogues d'abus, nous avons choisi d'étudier les conséquences sur les fonctions émotionnelles de l'abstinence à la morphine, après 1 ou 4 semaines d'abstinence, une fois les symptômes aigus de sevrage dissipés.

Nous mettons ici en évidence que quelle que soit la durée d'abstinence considérée, les souris abstinentes à la morphine ne montrent pas de modification des comportements de type anxieux en conditions basales, liés à l'exploration d'un environnement éclairé non protégé (champ ouvert, figure 18). Après une semaine d'abstinence, le pourcentage de temps passé au centre est bas (<10%) pour nos conditions expérimentales chez la souche C57BL6J (cf. groupe contrôle figure 23 également). Ceci pourrait refléter un état d'anxiété lié à l'historique récent des injections répétées dans les groupes morphine et saline. En effet ces procédures d'injections répétées sont stressantes pour les souris (Houshyar et al., 2003). C'est d'ailleurs en partie pour cette raison que nous avons mis au point un mode d'administration *per os* pour l'administration chronique de fluoxétine. Après 4 semaines d'abstinence, les animaux du groupe saline présentent un niveau basal de temps passé au centre aux alentours de 15-20%, stable (cf. figures 18 et 23) plus proche des valeurs attendues. De plus, ce résultat est conforté par l'absence de conduites anxieuses exagérées dans le test de la boîte claire/obscur (figure 24) 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, 1993; 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 certaines autres drogues d'abus,

une anxiété d'état semble difficile à révéler en conditions basales. Une seule étude met en évidence des changements, interprétés comme une diminution d'anxiété basale suite à 1 semaine d'abstinence à la morphine chez le rat (Peregud et al., 2008), mais ces données sont à considérer avec précaution, le groupe contrôle de cette expérience présentant un comportement anxieux prononcé (0% d'exploration des bras ouverts dans un labyrinthe en croix surélevé). Seules des réponses émotionnelles exagérées en réponse à un stress aigu sont décrites au cours d'une abstinence prolongée, comme dans le cas du test d'enfouissement d'une sonde électriée après 2 semaines d'abstinence (Harris and Aston-Jones, 2001), ou suite à l'application d'un stress de contention ou une injection de CRF avant le test du labyrinthe en croix surélevé après 1 semaine d'abstinence (Blatchford et al., 2006; Blatchford et al., 2005). Ceci suggère qu'une accentuation des réponses d'anxiété en réponse à un stress, mais non basales, peuvent être révélées chez des animaux abstinentes depuis 1 à 2 semaines.

Dans le test d'interaction sociale (figure 19) les déficits de comportements sociaux qui se traduisent par une diminution de la durée des interactions et une augmentation des comportements de toilettage individuel, ne sont pas attribuables ici à des modifications d'activité locomotrice (figure 18). Le toilettage individuel effectué de manière répétée et stéréotypée en présence d'un partenaire social, traduit un comportement compulsif de remplacement effectué dans le but de faire face à la situation stressante (Kalueff and Tuohimaa, 2005a; Kalueff and Tuohimaa, 2005b). Les données obtenues ici requièrent confirmation à une semaine, mais mettent en évidence le développement de déficits d'interaction sociale pendant les 4 semaines d'abstinence. Les modifications de ces deux paramètres, après un mois d'abstinence, peuvent refléter à la fois des comportements anxieux et/ou une baisse de l'intérêt social (File and Seth, 2003; Lapiz-Bluhm et al., 2008), deux éléments importants du syndrome d'abstinence (Satel et al., 1993). Cependant les conditions expérimentales utilisées ici (environnement familial, éclairage faible) minimisent la composante aversive (file 1993) et favorisent des durées d'interaction importantes, optimales pour modéliser un déficit de nature sociale et non de nature anxieuse. Le système opioïde joue un rôle important dans la promotion des comportements sociaux (maternels, grégaires, jeu social, statut social (Bodnar, 2007; Moles et al., 2004; Vanderschuren et al., 1997) et les comportements agressifs sont facilités au cours d'un sevrage précipité ou spontané (Sukhotina, 2001). Il serait intéressant de confirmer la part « sociale » du déficit observé ici à 4 semaines d'abstinence en évaluant d'autres comportements sociaux, comme la

détermination du statut social par exemple, et de caractériser la persistance de l'agressivité après la période de sevrage. Une seule étude s'est intéressée aux comportements sociaux après deux semaines d'abstinence à la morphine, et rapporte une augmentation de l'intérêt social et de la poursuite sexuelle chez le rat (Nocjar and Panksepp, 2007). Cependant les conditions expérimentales utilisées ici sont très différentes : outre un protocole d'induction de la dépendance différent (10 mg/kg pendant 10 jours), les interactions sont évaluées entre sujets de sexe opposé suite à un isolement temporaire des animaux d'expérience, procédure qui modifie les comportements sociaux (Niesink and van Ree, 1982). Ces résultats sont donc difficilement comparables à ceux de notre étude. Des déficits d'interactions sociales ont été mis en évidence chez la souris (Kompagne et al., 2008) dans un modèle murin de dépression, le stress chronique léger et imprévisible (Willner, 2005). Nous avons observé des déficits similaires de toilettage individuel et d'intérêt social dans un tel modèle (données non présentées), dans des conditions expérimentales identiques (procédure du test, fond génétique c57bl6J). Ceci suggère que les perturbations du comportement social observées pourraient traduire, outre des symptômes anxieux, des symptômes de type dépressif (Kompagne et al., 2008). Une perturbation des activités sociales est d'ailleurs décrite par le DSMIV et le retrait social accompagne les symptômes dépressifs chez l'homme (Kennedy et al., 2007; Tse and Bond, 2004).

Les perturbations comportementales observées sont globalement en accord avec une motivation diminuée envers des stimuli naturellement renforçants (anhédonie), tels que la nourriture (Harris and Aston-Jones, 2003) ou le sucrose (Zhang et al., 2007), au cours d'une période d'abstinence prolongée. Afin de confirmer un état émotionnel de type dépressif en situation ne mettant pas directement en jeu des propriétés de récompense, nous avons évalué les comportements de résignation des souris abstinentes dans les tests de nage forcée et de suspension caudale. Les souris abstinentes ne se comportent pas différemment des souris du groupe saline en situation de nage forcée (figure 21). Ceci est en contradiction avec des études précédentes effectuées chez le rat, qui indiquent une augmentation des comportements de type dépressifs chez des rats abstinentes à la morphine depuis 6 jours, (Anraku et al., 2001) ou 2-3 semaines (Grasing and Ghosh, 1998). La dose (jusqu'à 140 mg/kg), la fréquence (2 et 3x par jour respectivement), la durée (14 et 18 jours respectivement) de l'administration de morphine, ainsi que l'espèce utilisée, peuvent partiellement expliquer cette différence. Chez la souris, nous révélons une nette augmentation des comportements de résignation dans le test

de suspension caudale uniquement (figure 20). Malgré une robuste validité prédictive pour détecter, de manière aigüe, le potentiel antidépresseur de molécules, ces deux tests 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 C57BL6J peut montrer des réponses opposées dans ces tests suite à l'instauration d'un état dépressif dans le modèle de stress chronique (observations personnelles et (Mineur et al., 2006)). Le test de suspension caudale permet ici de mettre en évidence l'apparition de comportements de résignation (Cryan et al., 2005) chez la souris abstinente à la morphine. De façon intéressante, ces déficits semblent s'accroître avec la durée d'abstinence, la tendance observée à 1 semaine ne se révélant significativement qu'après 4 semaines d'abstinence, indiquant un développement graduel de l'état d'abstinence.

3. L'abstinence, un trouble émotionnel de type dépressif ?

Afin d'évaluer le caractère dépressif des troubles comportementaux qui se développent au cours de la période d'abstinence, nous avons administré un antidépresseur de référence à sélectivité sérotoninergique 24 h après l'interruption du traitement chronique avec la morphine. La dose de fluoxétine administrée a été choisie sur la base d'études préliminaires (données non présentées). Dans ces études 3, 10 ou 30 mg/kg de fluoxétine ont été administrés *per os* pendant 4 semaines à des animaux naïfs, afin de déterminer une dose *inefficace* sur leurs comportements locomoteurs et les comportements de résignation en condition contrôle. La dose de 30 mg/kg ayant révélé des symptômes caractéristiques de surdosage (perte de poids, anxiété), alors que la dose de 10 mg/kg a été retenue car elle n'affectait pas les comportements en conditions basales. Ainsi, l'administration chronique de 10 mg/kg de fluoxétine n'influence pas l'activité locomotrice (figure 23A), évitant tout biais expérimental dans les tests réalisés.

Dans les tests du champ ouvert et de la boîte claire/obscurité l'abstinence prolongée pendant 4 semaines n'affecte pas les réponses comportementales associées à l'anxiété basale. De manière surprenante, la fluoxétine réduit le nombre d'entrées, le pourcentage de temps passé au centre du dispositif du champ ouvert (figure 23B). De même, dans le test de la boîte claire/obscurité, le traitement chronique avec la fluoxétine diminue le temps passé et le nombre de transitions vers le compartiment éclairé (figure 24B). Ceci indique un effet anxiogène de

ce composé chez les souris abstinentes comme chez les souris contrôles. Cet effet n'est vraisemblablement pas la conséquence de l'arrêt du traitement fluoxétine 24 ou 48 heures auparavant, car ce composé est un des rares antidépresseurs qui produit très peu de symptômes de discontinuation en clinique (Fava, 2006; Rosenbaum et al., 1998). De plus, cette procédure est classiquement utilisée car la fluoxétine possède une demi-vie très importante, qui augmente avec la durée du traitement (DeVane, 1992; Stanford, 1996). Une majoration des réponses anxieuses est généralement décrite suite à une administration aiguë ou subchronique (quelques jours) d'IRSS dont la fluoxétine (Belzung et al., 2001; Dulawa et al., 2004). Le délai d'action des IRSS pour obtenir un effet bénéfique (anxiété et dépression) en clinique est attribué aux adaptations progressives du système sérotoninergique et à ses conséquences sur d'autres systèmes de neurotransmission impliqués dans les troubles de l'affect (Taylor et al., 2005). Une explication alternative serait liée à la dose utilisée qui pourrait être trop élevée pour ce mode d'administration, ou à la durée du traitement insuffisante pour laisser place aux adaptations requises pour réduire l'effet anxiogène de la fluoxétine. Toutefois, il est important de noter que cet effet anxiogène n'interfère pas avec les comportements de toilettage individuel ou sociaux chez les souris salines dans le test d'interaction sociale (figure 25). Ceci confirme que nos conditions expérimentales ne sont pas sensibles à l'anxiété, mais bien aux paramètres sociaux proprement dits. Le traitement chronique avec la fluoxétine ne modifie pas non plus les comportements de résignation des souris du groupe saline dans le test de suspension caudale (figure 26), suggérant que cet effet secondaire ne biaise pas l'interprétation des effets sur les comportements de résignation dans ce test. Au contraire, la diminution des comportements sociaux et l'exagération des comportements individuels induits par la morphine sont contrecarrés par la fluoxétine chez les souris abstinentes, tout comme le développement de comportements de résignation dans le test de suspension caudale. La fluoxétine est également efficace sur le paramètre de latence de première immobilisation. Ces données indiquent un effet antidépresseur du traitement chronique avec la fluoxétine.

Ainsi, la diminution des comportements sociaux dans nos conditions apparaît sensible aux effets bénéfiques du traitement chronique avec la fluoxétine, et non à son effet secondaire anxiogène, et reflèterait de ce fait principalement des perturbations de type dépressives. Nos données indiquent que les troubles comportementaux mis en évidence au cours d'une période d'abstinence prolongée sont dus, au moins partiellement, à des

modifications de transmission sérotoninergique qui entraînent des modifications basales des comportements de type dépressifs (sociaux, résignation) mais non anxieux. Des données préliminaires (non présentées) suggèrent que la fluoxétine administrée pendant une période de 4 semaines d'abstinence subséquentes à l'arrêt de la morphine puisse diminuer la sensibilité exagérée à la naloxone des souris abstinentes suite à une ré-exposition aiguë à la morphine. En accord avec cette idée, des données de la littérature indiquent qu'un antidépresseur à sélectivité mixte (NE et 5-HT), administré suite à l'acquisition d'une préférence de place associée à la morphine, diminue la ré-restauration initiée par une injection de morphine (Lu et al., 2001). D'autres drogues comme le MDMA qui produisent des lésions neurotoxiques spécifiques des neurones sérotoninergiques (Green et al., 2003; Nakagawa and Kaneko, 2008), induisent des déficits de comportements sociaux et dépressifs, sensibles au IRSS chez la souris (Kitanaka et al., 2008; Thompson et al., 2004). Ceci suggère que le syndrome d'abstinence comprend une composante sérotoninergique commune à plusieurs drogues d'abus.

Les mécanismes qui sous-tendent le développement des déficits comportementaux décrits restent encore à être déterminés. Plusieurs études indiquent une augmentation ou des modifications du couplage à certaines isoformes d'adénylate cyclase suite à la morphine chronique (Gintzler and Chakrabarti, 2006) en particulier une persistance d'une hyperactivité de l'adénylate cyclase au niveau de l'amygdale (Valverde et al., 1996). L'hypothèse de l'implication de modifications fonctionnelles du récepteur mu durables pourrait être testée ici, en évaluant le potentiel de la naloxone à contrecarrer les déficits type dépressifs observés à 1 et 4 semaines d'abstinence, comme cela a été montré pour l'immobilité passive chez le rat après 3 jours d'abstinence (Anraku et al., 2001). Les adaptations progressives des fonctions émotionnelles révélées par l'apparition graduelle de déficits comportementaux pourrait refléter développement de modifications de l'expression, ou de la fonctionnalité du système opioïde, au sein de structures limbiques d'intérêt telle que l'amygdale. L'amygdale étendue centrale, ensemble anatomo-fonctionnel constitué du noyau central de l'amygdale et du noyau du lit de la strie terminale, a été crucialement impliquée dans les déficits comportementaux hédoniques qui apparaissent suite à l'exposition répétée aux drogues d'abus (Smith and Aston-Jones, 2008), et contribue directement aux symptômes motivationnels et affectifs négatifs lors du sevrage (Avila et al., 2008). Elle constitue une région d'intérêt pour l'étude des adaptations neuronales sous-jacentes qui se développent suite à une exposition

prolongée aux opiacés. Au laboratoire, un crible de l'activité transcriptionnelle réalisé à l'échelle génomique suite à l'induction de la dépendance a permis d'identifier un ensemble de gènes mu-dépendants régulés suite à un traitement chronique avec la morphine, qui semblent majoritairement impliqués dans la signalisation et le remodelage neuronal (Befort et al., 2008). La persistance de telles adaptations, ou leurs conséquences, au sein de structures centrales dans le contrôle des réponses affectives comme l'amygdale, pourraient ainsi contribuer au développement d'un syndrome d'abstinence prolongé. Nous proposons ainsi que les troubles de comportement observés soient la conséquence de phénomènes de plasticité neuronale qui s'étendent au delà du système opioïde. La morphine et la fluoxétine ont été administrées successivement dans notre étude, et les effets de la fluoxétine ne peuvent de ce fait résulter d'une action directe sur les effets aigus de la morphine (Gray, 2002; Harris and Aston-Jones, 2001). La fluoxétine contrecarre ici les *conséquences* des adaptations plastiques engendrées préalablement par la morphine, suggérant des modifications durables de l'activité sérotoninergique suite au traitement morphine. En effet, l'administration répétée de morphine augmente le tonus GABAergique inhibiteur des interneurons du raphé, diminuant ainsi l'activité des neurones sérotoninergiques (Jolas et al., 2000; Tao et al., 1998). Les conséquences de cette diminution entraînent une adaptation des cibles de la 5-HT au niveau du raphé ou de ses structures de projection, comme l'amygdale ou l'hippocampe, qui pourraient être à l'origine des déficits affectifs observés. Un traitement chronique avec de la fluoxétine induit une désensibilisation des autorécepteurs pré-synaptiques 5-HT_{1A} des neurones du raphé et diminue ainsi progressivement leur inhibition tonique (Pejchal et al., 2002). Elle stabilise aussi la transmission sérotoninergique au niveau des structures cibles (Stahl, 1998) possiblement en agissant sur les enzymes limitantes dans sa synthèse comme la tryptophane hydroxylase 2 (Zhang et al., 2004) ou directement les récepteurs post synaptiques (Kobayashi et al., 2008). L'administration de fluoxétine dès le début de l'abstinence pourrait ainsi limiter les adaptations neuronales conséquentes à une diminution de transmission sérotoninergique.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'ensemble de nos données montre qu'une exposition intermittente et répétée à la morphine engendre le développement progressif de perturbations des conduites émotionnelles, particulièrement des comportements sociaux et des comportements de résignation après une période de 4 semaines d'abstinence. Ces déficits sont ici sensibles à l'administration chronique d'un antidépresseur à sélectivité sérotoninergique, suggérant une composante dépressive à l'état d'abstinence prolongée. Ces données complètent les perturbations motivationnelles et hédoniques décrites dans la littérature pendant une période d'abstinence prolongée. Il serait utile de confirmer que ces perturbations comportementales reflètent bien un état associé à la dépression dans nos conditions expérimentales, en évaluant un état d'anhédonie au sucrose par exemple, chez les souris abstinentes. L'implication de modifications de la transmission aminergique n'est pas nouvelle dans les théories de l'addiction et de la dépression, et la 5-HT pourrait constituer un système de neurotransmission à l'interface entre ces deux pathologies. Nous suggérons que les conséquences des adaptations neuronales, en réponse à l'interruption durable d'un traitement chronique à la morphine, y sont sensibles. Ceci permet tout d'abord d'envisager un accompagnement préventif supplémentaire en clinique, en traitement post-désintoxication, comme cela est déjà fait de manière empirique pour d'autres drogues d'abus telles que la cocaïne, la nicotine ou encore l'alcool (Hughes et al., 2007; Lima et al., 2003; Williams, 2005). Deuxièmement, ceci permet d'envisager la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques, à l'interface entre addiction et dépression. En effet, cette caractérisation comportementale s'inscrit dans un projet plus vaste au laboratoire, visant à élucider les adaptations plastiques communes et durables engendrées par différentes drogues d'abus (alcool, THC, nicotine) ou le stress. Il serait tout d'abord intéressant d'étudier la persistance des régulations géniques au sein des structures contrôlant les réponses émotionnelles, induites par l'exposition chronique à la morphine (Befort et al., 2008) ou aux autres drogues. Une approche plus spécifique à la condition d'abstinence serait réalisable par un crible génomique indépendant, après une période de 4 semaines d'abstinence morphinique. Les candidats potentiels qui en ressortiraient pourraient ensuite être sélectionnés en fonction de leur sensibilité à un traitement chronique de fluoxétine, ou au stress chronique (traitements anti ou pro-dépresseurs), et constitueraient de ce fait des cibles de choix, pour le traitement du syndrome d'abstinence aux opiacés qui contribue à la récurrence caractéristique de l'addiction.

REFERENCES

(1999). Corrigendum. *J Comp Neurol* 412, 708.

Adams, J. P., Anderson, A. E., Varga, A. W., Dineley, K. T., Cook, R. G., Pfaffinger, P. J., and Sweatt, J. D. (2000a). The A-type potassium channel Kv4.2 is a substrate for the mitogen-activated protein kinase ERK. *J Neurochem* 75, 2277-2287.

Adams, J. P., Roberson, E. D., English, J. D., Selcher, J. C., and Sweatt, J. D. (2000b). MAPK regulation of gene expression in the central nervous system. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 60, 377-394.

Adams, J. P., and Sweatt, J. D. (2002). Molecular psychology: roles for the ERK MAP kinase cascade in memory. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42, 135-163.

Aggleton, J. P., and Brown, M. W. (2005). Contrasting hippocampal and perirhinal cortex function using immediate early gene imaging. *Q J Exp Psychol B* 58, 218-233.

Aggleton, J. P., and Brown, M. W. (2006). Interleaving brain systems for episodic and recognition memory. *Trends Cogn Sci* 10, 455-463.

Ahi, J., Radulovic, J., and Spiess, J. (2004). The role of hippocampal signaling cascades in consolidation of fear memory. *Behav Brain Res* 149, 17-31.

Akaoka, H., and Aston-Jones, G. (1993). Indirect serotonergic agonists attenuate neuronal opiate withdrawal. *Neuroscience* 54, 561-565.

Allen, R. G., Peng, B., Pellegrino, M. J., Miller, E. D., Grandy, D. K., Lundblad, J. R., Washburn, C. L., and Pintar, J. E. (2001). Altered processing of pro-orphanin FQ/nociceptin and pro-opiomelanocortin-derived peptides in the brains of mice expressing defective prohormone convertase 2. *J Neurosci* 21, 5864-5870.

Alonso, M., Viola, H., Izquierdo, I., and Medina, J. H. (2002). Aversive experiences are associated with a rapid and transient activation of ERKs in the rat hippocampus. *Neurobiol Learn Mem* 77, 119-124.

Alvarez, P., Zola-Morgan, S., and Squire, L. R. (1994). The animal model of human amnesia: long-term memory impaired and short-term memory intact. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 5637-5641.

Amaral, D. G., and Witter, M. P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31, 571-591.

Ammon-Treiber, S., and Holtt, V. (2005). Morphine-induced changes of gene expression in the brain. *Addict Biol* 10, 81-89.

Anagnostaras, S. G., Gale, G. D., and Fanselow, M. S. (2001). Hippocampus and contextual fear conditioning: recent controversies and advances. *Hippocampus* 11, 8-17.

Anagnostaras, S. G., Maren, S., and Fanselow, M. S. (1999). Temporally graded retrograde amnesia of contextual fear after hippocampal damage in rats: within-subjects examination. *J Neurosci* 19, 1106-1114.

- Anraku, T., Ikegaya, Y., Matsuki, N., and Nishiyama, N. (2001). Withdrawal from chronic morphine administration causes prolonged enhancement of immobility in rat forced swimming test. *Psychopharmacology (Berl)* 157, 217-220.
- Anton, B., Fein, J., To, T., Li, X., Silberstein, L., and Evans, C. J. (1996). Immunohistochemical localization of ORL-1 in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol* 368, 229-251.
- Armstead, W. M. (2006). Differential activation of ERK, p38, and JNK MAPK by nociceptin/orphanin FQ in the potentiation of prostaglandin cerebrovasoconstriction after brain injury. *Eur J Pharmacol* 529, 129-135.
- Aston-Jones, G., and Harris, G. C. (2004). Brain substrates for increased drug seeking during protracted withdrawal. *Neuropharmacology* 47 Suppl 1, 167-179.
- Atkins, C. M., Selcher, J. C., Petraitis, J. J., Trzaskos, J. M., and Sweatt, J. D. (1998). The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nat Neurosci* 1, 602-609.
- Avila, M. A., Ruggiero, R. N., Cabral, A., Brandao, M. L., Nobre, M. J., and Castilho, V. M. (2008). Involvement of the midbrain tectum in the unconditioned fear promoted by morphine withdrawal. *Eur J Pharmacol* 590, 217-223.
- Azar, M. R., Jones, B. C., and Schulteis, G. (2003). Conditioned place aversion is a highly sensitive index of acute opioid dependence and withdrawal. *Psychopharmacology (Berl)* 170, 42-50.
- Azolosa, J. L., Stitzer, M. L., and Greenwald, M. K. (1994). Opioid physical dependence development: effects of single versus repeated morphine pretreatments and of subjects' opioid exposure history. *Psychopharmacology (Berl)* 114, 71-80.
- Baddeley, A. (1996). The fractionation of working memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13468-13472.
- Bai, F., Li, X., Clay, M., Lindstrom, T., and Skolnick, P. (2001). Intra- and interstrain differences in models of "behavioral despair". *Pharmacol Biochem Behav* 70, 187-192.
- Baker, K. B., and Kim, J. J. (2002). Effects of stress and hippocampal NMDA receptor antagonism on recognition memory in rats. *Learn Mem* 9, 58-65.
- Balderas, I., Rodriguez-Ortiz, C. J., Salgado-Tonda, P., Chavez-Hurtado, J., McGaugh, J. L., and Bermudez-Rattoni, F. (2008). The consolidation of object and context recognition memory involve different regions of the temporal lobe. *Learn Mem* 15, 618-624.
- Bannerman, D. M., Rawlins, J. N., and Good, M. A. (2006). The drugs don't work-or do they? Pharmacological and transgenic studies of the contribution of NMDA and GluR-A-containing AMPA receptors to hippocampal-dependent memory. *Psychopharmacology (Berl)* 188, 552-566.
- Bannerman, D. M., Rawlins, J. N., McHugh, S. B., Deacon, R. M., Yee, B. K., Bast, T., Zhang, W. N., Pothuizen, H. H., and Feldon, J. (2004). Regional dissociations within the hippocampus--memory and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev* 28, 273-283.
- Barco, A., Bailey, C. H., and Kandel, E. R. (2006). Common molecular mechanisms in explicit and implicit memory. *J Neurochem* 97, 1520-1533.

- Bardgett, M. E., Boeckman, R., Krochmal, D., Fernando, H., Ahrens, R., and Csernansky, J. G. (2003). NMDA receptor blockade and hippocampal neuronal loss impair fear conditioning and position habit reversal in C57Bl/6 mice. *Brain Res Bull* 60, 131-142.
- Barker, G. R., Bird, F., Alexander, V., and Warburton, E. C. (2007). Recognition memory for objects, place, and temporal order: a disconnection analysis of the role of the medial prefrontal cortex and perirhinal cortex. *J Neurosci* 27, 2948-2957.
- Bast, T. (2007). Toward an integrative perspective on hippocampal function: from the rapid encoding of experience to adaptive behavior. *Rev Neurosci* 18, 253-281.
- Bast, T., Zhang, W. N., and Feldon, J. (2003). Dorsal hippocampus and classical fear conditioning to tone and context in rats: effects of local NMDA-receptor blockade and stimulation. *Hippocampus* 13, 657-675.
- Bechara, A., Tranel, D., Damasio, H., Adolphs, R., Rockland, C., and Damasio, A. R. (1995). Double dissociation of conditioning and declarative knowledge relative to the amygdala and hippocampus in humans. *Science* 269, 1115-1118.
- Becker, J. A., Wallace, A., Garzon, A., Ingallinella, P., Bianchi, E., Cortese, R., Simonin, F., Kieffer, B. L., and Pessi, A. (1999). Ligands for kappa-opioid and ORL1 receptors identified from a conformationally constrained peptide combinatorial library. *J Biol Chem* 274, 27513-27522.
- Beftor, K., Filliol, D., Ghate, A., Darcq, E., Matifas, A., Muller, J., Lardenois, A., Thibault, C., Dembele, D., Le Merrer, J., *et al.* (2008). Mu-opioid receptor activation induces transcriptional plasticity in the central extended amygdala. *Eur J Neurosci* 27, 2973-2984.
- Belzung, C., Le Guisquet, A. M., Barreau, S., and Calatayud, F. (2001). An investigation of the mechanisms responsible for acute fluoxetine-induced anxiogenic-like effects in mice. *Behav Pharmacol* 12, 151-162.
- Berkeley, J. L., and Levey, A. I. (2003). Cell-specific extracellular signal-regulated kinase activation by multiple G protein-coupled receptor families in hippocampus. *Mol Pharmacol* 63, 128-135.
- Berman, D. E., Hazvi, S., Rosenblum, K., Seger, R., and Dudai, Y. (1998). Specific and differential activation of mitogen-activated protein kinase cascades by unfamiliar taste in the insular cortex of the behaving rat. *J Neurosci* 18, 10037-10044.
- Bernabeu, R., Bevilacqua, L., Ardenghi, P., Bromberg, E., Schmitz, P., Bianchin, M., Izquierdo, I., and Medina, J. H. (1997). Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 7041-7046.
- Berthele, A., Platzer, S., Dworzak, D., Schadrack, J., Mahal, B., Buttner, A., Assmus, H. P., Wurster, K., Zieglansberger, W., Conrad, B., and Tolle, T. R. (2003). [3H]-nociceptin ligand-binding and nociceptin opioid receptor mRNA expression in the human brain. *Neuroscience* 121, 629-640.
- Berton, O., and Nestler, E. J. (2006). New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat Rev Neurosci* 7, 137-151.
- Bevilacqua, L. R., Kerr, D. S., Medina, J. H., Izquierdo, I., and Cammarota, M. (2003). Inhibition of hippocampal Jun N-terminal kinase enhances short-term memory but blocks long-term memory formation and retrieval of an inhibitory avoidance task. *Eur J Neurosci* 17, 897-902.

- Bevilaqua, L. R., Rossato, J. I., Clarke, J. H., Medina, J. H., Izquierdo, I., and Cammarota, M. (2007). Inhibition of c-Jun N-terminal kinase in the CA1 region of the dorsal hippocampus blocks extinction of inhibitory avoidance memory. *Behav Pharmacol* *18*, 483-489.
- Biedenkapp, J. C., and Rudy, J. W. (2004). Context memories and reactivation: constraints on the reconsolidation hypothesis. *Behav Neurosci* *118*, 956-964.
- Blanchard, D. C., and Blanchard, R. J. (1972). Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. *J Comp Physiol Psychol* *81*, 281-290.
- Blatchford, K. E., Choi, E. A., and McNally, G. P. (2006). Altered responsivity to central administrations of corticotropin-releasing factor in rats with a history of opiate exposures. *Behav Neurosci* *120*, 1169-1174.
- Blatchford, K. E., Diamond, K., Westbrook, R. F., and McNally, G. P. (2005). Increased vulnerability to stress following opiate exposures: behavioral and autonomic correlates. *Behav Neurosci* *119*, 1034-1041.
- Bliss, T. V., and Collingridge, G. L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* *361*, 31-39.
- Bliss, T. V., and Lomo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* *232*, 331-356.
- Blum, S., Moore, A. N., Adams, F., and Dash, P. K. (1999). A mitogen-activated protein kinase cascade in the CA1/CA2 subfield of the dorsal hippocampus is essential for long-term spatial memory. *J Neurosci* *19*, 3535-3544.
- Bodnar, R. J. (2007). Endogenous opiates and behavior: 2006. *Peptides* *28*, 2435-2513.
- Boggio, E. M., Putignano, E., Sassoe-Pognetto, M., Pizzorusso, T., and Giustetto, M. (2007). Visual stimulation activates ERK in synaptic and somatic compartments of rat cortical neurons with parallel kinetics. *PLoS ONE* *2*, e604.
- Bolshakov, V. Y., Carboni, L., Cobb, M. H., Siegelbaum, S. A., and Belardetti, F. (2000). Dual MAP kinase pathways mediate opposing forms of long-term plasticity at CA3-CA1 synapses. *Nat Neurosci* *3*, 1107-1112.
- Bongsebandhu-phubhakdi, S., and Manabe, T. (2007). The neuropeptide nociceptin is a synaptically released endogenous inhibitor of hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci* *27*, 4850-4858.
- Bontempi, B., Laurent-Demir, C., Destrade, C., and Jaffard, R. (1999). Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage. *Nature* *400*, 671-675.
- Boom, A., Mollereau, C., Meunier, J. C., Vassart, G., Parmentier, M., Vanderhaeghen, J. J., and Schiffmann, S. N. (1999). Distribution of the nociceptin and nocistatin precursor transcript in the mouse central nervous system. *Neuroscience* *91*, 991-1007.
- Bourin, M., Chenu, F., Ripoll, N., and David, D. J. (2005). A proposal of decision tree to screen putative antidepressants using forced swim and tail suspension tests. *Behav Brain Res* *164*, 266-269.
- Bourtchuladze, R., Frenguelli, B., Blendy, J., Cioffi, D., Schutz, G., and Silva, A. J. (1994). Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell* *79*, 59-68.

- Bredt, D. S., and Nicoll, R. A. (2003). AMPA receptor trafficking at excitatory synapses. *Neuron* 40, 361-379.
- Breivik, H. (2005). Opioids in chronic non-cancer pain, indications and controversies. *Eur J Pain* 9, 127-130.
- Brewer, D. D., Catalano, R. F., Haggerty, K., Gainey, R. R., and Fleming, C. B. (1998). A meta-analysis of predictors of continued drug use during and after treatment for opiate addiction. *Addiction* 93, 73-92.
- Bridge, K. E., Wainwright, A., Reilly, K., and Oliver, K. R. (2003). Autoradiographic localization of (125)I[Tyr(14)] nociceptin/orphanin FQ binding sites in macaque primate CNS. *Neuroscience* 118, 513-523.
- Brodkin, J. (1999). Assessing memory in mice using habituation of nose-poke responding. *Behav Pharmacol* 10, 445-451.
- Brown, M. W. (2008). Hippocampal and perirhinal functions in recognition memory. *Nat Rev Neurosci* 9, 405; author reply 405.
- Brown, M. W., and Aggleton, J. P. (2001). Recognition memory: what are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus? *Nat Rev Neurosci* 2, 51-61.
- Bunsey, M., and Eichenbaum, H. (1996). Conservation of hippocampal memory function in rats and humans. *Nature* 379, 255-257.
- Bunzow, J. R., Saez, C., Mortrud, M., Bouvier, C., Williams, J. T., Low, M., and Grandy, D. K. (1994). Molecular cloning and tissue distribution of a putative member of the rat opioid receptor gene family that is not a mu, delta or kappa opioid receptor type. *FEBS Lett* 347, 284-288.
- Caille, S., Espejo, E. F., Koob, G. F., and Stinus, L. (2002). Dorsal and median raphe serotonergic system lesion does not alter the opiate withdrawal syndrome. *Pharmacol Biochem Behav* 72, 979-986.
- Caille, S., Espejo, E. F., Reneric, J. P., Cador, M., Koob, G. F., and 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, 881-892.
- Caille, S., Stinus, L., Espejo, E. F., De Deurwaerdere, P., Spampinato, U., and Koob, G. F. (2003). Inhibition of 5-HT neurotransmission increases clonidine protective effects on naloxone-induced conditioned place aversion in morphine-dependent rats. *Neuropsychopharmacology* 28, 276-283.
- Calo, G., Rizzi, A., Rizzi, D., Bigoni, R., Guerrini, R., Marzola, G., Marti, M., McDonald, J., Morari, M., Lambert, D. G., *et al.* (2002). [Nphe1,Arg14,Lys15]nociceptin-NH2, a novel potent and selective antagonist of the nociceptin/orphanin FQ receptor. *Br J Pharmacol* 136, 303-311.
- Cammarota, M., Bevilaqua, L. R., Ardenghi, P., Paratcha, G., Levi de Stein, M., Izquierdo, I., and Medina, J. H. (2000). Learning-associated activation of nuclear MAPK, CREB and Elk-1, along with Fos production, in the rat hippocampus after a one-trial avoidance learning: abolition by NMDA receptor blockade. *Brain Res Mol Brain Res* 76, 36-46.
- Cammarota, M., Bevilaqua, L. R., Barros, D. M., Vianna, M. R., Izquierdo, L. A., Medina, J. H., and Izquierdo, I. (2005). Retrieval and the extinction of memory. *Cell Mol Neurobiol* 25, 465-474.

- Carey, R. J., Dai, H., and Gui, J. (1998). Effects of dizocilpine (MK-801) on motor activity and memory. *Psychopharmacology (Berl)* 137, 241-246.
- Carra, G., Rizzi, A., Guerrini, R., Barnes, T. A., McDonald, J., Hebbes, C. P., Mela, F., Kenigs, V. A., Marzola, G., Rizzi, D., *et al.* (2005). [(pF)Phe⁴,Arg¹⁴,Lys¹⁵]N/OFQ-NH₂ (UFP-102), a highly potent and selective agonist of the nociceptin/orphanin FQ receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 312, 1114-1123.
- Cassel, J. C., and Kelche, C. (1989). Scopolamine treatment and fimbria-fornix lesions: mimetic effects on radial maze performance. *Physiol Behav* 46, 347-353.
- Castilho, V. M., Borelli, K. G., Brandao, M. L., and 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, 552-562.
- Chan, A. S., and Wong, Y. H. (2000). Regulation of c-Jun N-terminal kinase by the ORL(1) receptor through multiple G proteins. *J Pharmacol Exp Ther* 295, 1094-1100.
- Chan, J. S., Yung, L. Y., Lee, J. W., Wu, Y. L., Pei, G., and Wong, Y. H. (1998). Pertussis toxin-insensitive signaling of the ORL1 receptor: coupling to G_z and G₁₆ proteins. *J Neurochem* 71, 2203-2210.
- Chang, S. D., Chen, D. Y., and Liang, K. C. (2008). Infusion of lidocaine into the dorsal hippocampus before or after the shock training phase impaired conditioned freezing in a two-phase training task of contextual fear conditioning. *Neurobiol Learn Mem* 89, 95-105.
- Chapoutier, G. *Biologie de la mémoire*, éditions Odile Jacob, 2006.
- Chen, L. X., Wang, Z. Z., Wu, H., Fang, Q., Chen, Y., and Wang, R. (2002). Effects of nociceptin (13-17) in pain modulation at supraspinal level in mice. *Neurosci Lett* 331, 95-98.
- Chen, L. Y., Huang, J. X., and Yu, L. C. (2008). Involvement of ORL1 receptor and ERK kinase in the orphanin FQ-induced nociception in the nucleus accumbens of rats. *Regul Pept*.
- Chen, Y., Fan, Y., Liu, J., Mestek, A., Tian, M., Kozak, C. A., and Yu, L. (1994). Molecular cloning, tissue distribution and chromosomal localization of a novel member of the opioid receptor gene family. *FEBS Lett* 347, 279-283.
- Childress, A. R., Ehrman, R., McLellan, A. T., MacRae, J., Natale, M., and O'Brien, C. P. (1994). Can induced moods trigger drug-related responses in opiate abuse patients? *J Subst Abuse Treat* 11, 17-23.
- Chiou, L. C., Liao, Y. Y., Fan, P. C., Kuo, P. H., Wang, C. H., Riemer, C., and Prinssen, E. P. (2007). Nociceptin/orphanin FQ peptide receptors: pharmacology and clinical implications. *Curr Drug Targets* 8, 117-135.
- Chwang, W. B., Arthur, J. S., Schumacher, A., and Sweatt, J. D. (2007). The nuclear kinase mitogen- and stress-activated protein kinase 1 regulates hippocampal chromatin remodeling in memory formation. *J Neurosci* 27, 12732-12742.
- Ciccocioppo, R., Cippitelli, A., Economidou, D., Fedeli, A., and Massi, M. (2004). Nociceptin/orphanin FQ acts as a functional antagonist of corticotropin-releasing factor to inhibit its anorectic effect. *Physiol Behav* 82, 63-68.

- Clark, R. E., West, A. N., Zola, S. M., and Squire, L. R. (2001). Rats with lesions of the hippocampus are impaired on the delayed nonmatching-to-sample task. *Hippocampus* *11*, 176-186.
- Clayton, D. F. (2000). The genomic action potential. *Neurobiol Learn Mem* *74*, 185-216.
- Clayton, N. S., Bussey, T. J., and Dickinson, A. (2003). Can animals recall the past and plan for the future? *Nat Rev Neurosci* *4*, 685-691.
- Clayton, N. S., and Dickinson, A. (1998). Episodic-like memory during cache recovery by scrub jays. *Nature* *395*, 272-274.
- Cohen, N. J., Eichenbaum, H., Deacedo, B. S., and Corkin, S. (1985). Different memory systems underlying acquisition of procedural and declarative knowledge. *Ann N Y Acad Sci* *444*, 54-71.
- Colbran, R. J., and Brown, A. M. (2004). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* *14*, 318-327.
- Connor, M., and Christie, M. D. (1999). Opioid receptor signalling mechanisms. *Clin Exp Pharmacol Physiol* *26*, 493-499.
- Connor, M., Vaughan, C. W., Chieng, B., and Christie, M. J. (1996). Nociceptin receptor coupling to a potassium conductance in rat locus coeruleus neurones in vitro. *Br J Pharmacol* *119*, 1614-1618.
- Cravens, C. J., Vargas-Pinto, N., Christian, K. M., and Nakazawa, K. (2006). CA3 NMDA receptors are crucial for rapid and automatic representation of context memory. *Eur J Neurosci* *24*, 1771-1780.
- Cryan, J. F., and Holmes, A. (2005). The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nat Rev Drug Discov* *4*, 775-790.
- Cryan, J. F., Mombereau, C., and 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'Esposito, M. (2007). From cognitive to neural models of working memory. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* *362*, 761-772.
- Danielson, P. B., and Dores, R. M. (1999). Molecular evolution of the opioid/orphanin gene family. *Gen Comp Endocrinol* *113*, 169-186.
- Darland, T., Heinricher, M. M., and Grandy, D. K. (1998). Orphanin FQ/nociceptin: a role in pain and analgesia, but so much more. *Trends Neurosci* *21*, 215-221.
- Dautzenberg, F. M., Wichmann, J., Higelin, J., Py-Lang, G., Kratzeisen, C., Malherbe, P., Kilpatrick, G. J., and Jenck, F. (2001). Pharmacological characterization of the novel nonpeptide orphanin FQ/nociceptin receptor agonist Ro 64-6198: rapid and reversible desensitization of the ORL1 receptor in vitro and lack of tolerance in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* *298*, 812-819.
- Davis, M. (1992). The role of the amygdala in fear and anxiety. *Annu Rev Neurosci* *15*, 353-375.
- Davis, M., and Whalen, P. J. (2001). The amygdala: vigilance and emotion. *Mol Psychiatry* *6*, 13-34.

- Davis, S., and Laroche, S. (2006). Mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase signalling and memory stabilization: a review. *Genes Brain Behav* 5 *Suppl* 2, 61-72.
- Davis, S., Vanhoutte, P., Pages, C., Caboche, J., and Laroche, S. (2000). The MAPK/ERK cascade targets both Elk-1 and cAMP response element-binding protein to control long-term potentiation-dependent gene expression in the dentate gyrus in vivo. *J Neurosci* 20, 4563-4572.
- Day, M., Langston, R., and Morris, R. G. (2003). Glutamate-receptor-mediated encoding and retrieval of paired-associate learning. *Nature* 424, 205-209.
- de Lima, M. N., Laranja, D. C., Bromberg, E., Roesler, R., and Schroder, N. (2005). Pre- or post-training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impairs object recognition memory in rats. *Behav Brain Res* 156, 139-143.
- Delfs, J. M., Zhu, Y., Druhan, J. P., and Aston-Jones, G. (2000). Noradrenaline in the ventral forebrain is critical for opiate withdrawal-induced aversion. *Nature* 403, 430-434.
- Dere, E., Huston, J. P., and De Souza Silva, M. A. (2005). Integrated memory for objects, places, and temporal order: evidence for episodic-like memory in mice. *Neurobiol Learn Mem* 84, 214-221.
- Dere, E., Huston, J. P., and De Souza Silva, M. A. (2007). The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. *Neurosci Biobehav Rev* 31, 673-704.
- DeVane, C. L. (1992). Pharmacokinetics of the selective serotonin reuptake inhibitors. *J Clin Psychiatry* 53 *Suppl*, 13-20.
- Devine, D. P., Reinscheid, R. K., Monsma, F. J., Jr., Civelli, O., and Akil, H. (1996a). The novel neuropeptide orphanin FQ fails to produce conditioned place preference or aversion. *Brain Res* 727, 225-229.
- Devine, D. P., Taylor, L., Reinscheid, R. K., Monsma, F. J., Jr., Civelli, O., and Akil, H. (1996b). Rats rapidly develop tolerance to the locomotor-inhibiting effects of the novel neuropeptide orphanin FQ. *Neurochem Res* 21, 1387-1396.
- Devine, D. P., Watson, S. J., and Akil, H. (2001). Nociceptin/orphanin FQ regulates neuroendocrine function of the limbic-hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuroscience* 102, 541-553.
- Diana, M., Pistis, M., Muntoni, A., and Gessa, G. (1995). Profound decrease of mesolimbic dopaminergic neuronal activity in morphine withdrawn rats. *J Pharmacol Exp Ther* 272, 781-785.
- Diana, R. A., Yonelinas, A. P., and Ranganath, C. (2007). Imaging recollection and familiarity in the medial temporal lobe: a three-component model. *Trends Cogn Sci* 11, 379-386.
- Dodart, J. C., Mathis, C., and Ungerer, A. (1997). Scopolamine-induced deficits in a two-trial object recognition task in mice. *Neuroreport* 8, 1173-1178.
- Dole, V. P., Nyswander, M. E., and Kreek, M. J. (1991). Narcotic blockade. 1966. *J Psychoactive Drugs* 23, following 232.
- Dooley, C. T., Spaeth, C. G., Berzetei-Gurske, I. P., Craymer, K., Adapa, I. D., Brandt, S. R., Houghten, R. A., and Toll, L. (1997). Binding and in vitro activities of peptides with high affinity for the nociceptin/orphanin FQ receptor, ORL1. *J Pharmacol Exp Ther* 283, 735-741.

- Dudai, Y. (2002). Molecular bases of long-term memories: a question of persistence. *Curr Opin Neurobiol* 12, 211-216.
- Dudai, Y. (2006). Reconsolidation: the advantage of being refocused. *Curr Opin Neurobiol* 16, 174-178.
- Dulawa, S. C., Holick, K. A., Gundersen, B., and Hen, R. (2004). Effects of chronic fluoxetine in animal models of anxiety and depression. *Neuropsychopharmacology* 29, 1321-1330.
- Duvarci, S., Nader, K., and LeDoux, J. E. (2005). Activation of extracellular signal-regulated kinase- mitogen-activated protein kinase cascade in the amygdala is required for memory reconsolidation of auditory fear conditioning. *Eur J Neurosci* 21, 283-289.
- Eacott, M. J., and Easton, A. (2007). On familiarity and recall of events by rats. *Hippocampus* 17, 890-897.
- Eacott, M. J., and Norman, G. (2004). Integrated memory for object, place, and context in rats: a possible model of episodic-like memory? *J Neurosci* 24, 1948-1953.
- Eichenbaum, H. (2000). A cortical-hippocampal system for declarative memory. *Nat Rev Neurosci* 1, 41-50.
- Eichenbaum, H., and Fortin, N. J. (2005). Bridging the gap between brain and behavior: cognitive and neural mechanisms of episodic memory. *J Exp Anal Behav* 84, 619-629.
- el-Kadi, A. O., and Sharif, S. I. (1994). The influence of various experimental conditions on the expression of naloxone-induced withdrawal symptoms in mice. *Gen Pharmacol* 25, 1505-1510.
- Engin, E., and Treit, D. (2007). The role of hippocampus in anxiety: intracerebral infusion studies. *Behav Pharmacol* 18, 365-374.
- Ennaceur, A., and Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res* 31, 47-59.
- Ennaceur, A., Neave, N., and Aggleton, J. P. (1997). Spontaneous object recognition and object location memory in rats: the effects of lesions in the cingulate cortices, the medial prefrontal cortex, the cingulum bundle and the fornix. *Exp Brain Res* 113, 509-519.
- Ergorul, C., and Eichenbaum, H. (2004). The hippocampus and memory for "what," "where," and "when". *Learn Mem* 11, 397-405.
- Evans, C. J., Keith, D. E., Jr., Morrison, H., Magendzo, K., and Edwards, R. H. (1992). Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science* 258, 1952-1955.
- Fadda, P., Scherma, M., Fresu, A., Collu, M., and 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.
- Fanselow, M. S. (2000). Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. *Behav Brain Res* 110, 73-81.
- Fanselow, M. S., and Poulos, A. M. (2005). The neuroscience of mammalian associative learning. *Annu Rev Psychol* 56, 207-234.

- Fava, M. (2006). Prospective studies of adverse events related to antidepressant discontinuation. *J Clin Psychiatry* 67 Suppl 4, 14-21.
- Fernandez, S. M., Lewis, M. C., Pechenino, A. S., Harburger, L. L., Orr, P. T., Gresack, J. E., Schafe, G. E., and Frick, K. M. (2008). Estradiol-induced enhancement of object memory consolidation involves hippocampal extracellular signal-regulated kinase activation and membrane-bound estrogen receptors. *J Neurosci* 28, 8660-8667.
- File, S. E., and Hyde, J. R. (1978). Can social interaction be used to measure anxiety? *Br J Pharmacol* 62, 19-24.
- File, S. E., Kenny, P. J., and Cheeta, S. (2000). The role of the dorsal hippocampal serotonergic and cholinergic systems in the modulation of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 66, 65-72.
- File, S. E., and Seth, P. (2003). A review of 25 years of the social interaction test. *Eur J Pharmacol* 463, 35-53.
- Florin, S., Leroux-Nicollet, I., Meunier, J. C., and Costentin, J. (1997). Autoradiographic localization of [3H]nociceptin binding sites from telencephalic to mesencephalic regions of the mouse brain. *Neurosci Lett* 230, 33-36.
- Florin, S., Meunier, J., and Costentin, J. (2000). Autoradiographic localization of [3H]nociceptin binding sites in the rat brain. *Brain Res* 880, 11-16.
- Florin, S., Suaudeau, C., Meunier, J. C., and Costentin, J. (1996). Nociceptin stimulates locomotion and exploratory behaviour in mice. *Eur J Pharmacol* 317, 9-13.
- Fornari, R. V., Soares, J. C., Ferreira, T. L., Moreira, K. M., and Oliveira, M. G. (2008). Effects of nociceptin/orphanin FQ in the acquisition of contextual and tone fear conditioning in rats. *Behav Neurosci* 122, 98-106.
- Fortin, N. J., Wright, S. P., and Eichenbaum, H. (2004). Recollection-like memory retrieval in rats is dependent on the hippocampus. *Nature* 431, 188-191.
- Frankland, P. W., and Bontempi, B. (2005). The organization of recent and remote memories. *Nat Rev Neurosci* 6, 119-130.
- Frankland, P. W., Josselyn, S. A., Anagnostaras, S. G., Kogan, J. H., Takahashi, E., and Silva, A. J. (2004). Consolidation of CS and US representations in associative fear conditioning. *Hippocampus* 14, 557-569.
- Frey, U., and Morris, R. G. (1997). Synaptic tagging and long-term potentiation. *Nature* 385, 533-536.
- Fukuda, K., Kato, S., Mori, K., Nishi, M., Takeshima, H., Iwabe, N., Miyata, T., Houtani, T., and Sugimoto, T. (1994). cDNA cloning and regional distribution of a novel member of the opioid receptor family. *FEBS Lett* 343, 42-46.
- Gavioli, E. C., Marzola, G., Guerrini, R., Bertorelli, R., Zucchini, S., De Lima, T. C., Rae, G. A., Salvadori, S., Regoli, D., and Calo, G. (2003). Blockade of nociceptin/orphanin FQ-NOP receptor signalling produces antidepressant-like effects: pharmacological and genetic evidences from the mouse forced swimming test. *Eur J Neurosci* 17, 1987-1990.

- Gavioli, E. C., Rae, G. A., Calo, G., Guerrini, R., and De Lima, T. C. (2002). Central injections of nocistatin or its C-terminal hexapeptide exert anxiogenic-like effect on behaviour of mice in the plus-maze test. *Br J Pharmacol* *136*, 764-772.
- Gavioli, E. C., Rizzi, A., Marzola, G., Zucchini, S., Regoli, D., and Calo, G. (2007). Altered anxiety-related behavior in nociceptin/orphanin FQ receptor gene knockout mice. *Peptides* *28*, 1229-1239.
- Gavioli, E. C., Vaughan, C. W., Marzola, G., Guerrini, R., Mitchell, V. A., Zucchini, S., De Lima, T. C., Rae, G. A., Salvadori, S., Regoli, D., and Calo, G. (2004). Antidepressant-like effects of the nociceptin/orphanin FQ receptor antagonist UFP-101: new evidence from rats and mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* *369*, 547-553.
- Gazzaniga, M.S., Ivry R.B., Mangun G.R.(2001) "Cognitive neuroscience, the Biology of the Mind" De Boeck,
- Gehlert, D. R., Gackenhaimer, S. L., and Shaw, J. L. (2006). Distribution of nociceptin and Ro64-6198 activated [35S]-GTPgammaS binding in the rat brain. *Neuropeptides* *40*, 95-105.
- Gerra, G., Leonardi, C., D'Amore, A., Strepparola, G., Fagetti, R., Assi, C., Zaimovic, A., and Lucchini, A. (2006). Buprenorphine treatment outcome in dually diagnosed heroin dependent patients: A retrospective study. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* *30*, 265-272.
- Gintzler, A. R., and Chakrabarti, S. (2006). Post-opioid receptor adaptations to chronic morphine; altered functionality and associations of signaling molecules. *Life Sci* *79*, 717-722.
- Giovannini, M. G. (2006). The role of the extracellular signal-regulated kinase pathway in memory encoding. *Rev Neurosci* *17*, 619-634.
- Girault, J. A., Valjent, E., Caboche, J., and Herve, D. (2007). ERK2: a logical AND gate critical for drug-induced plasticity? *Curr Opin Pharmacol* *7*, 77-85.
- Goeders, N. E. (2003). The impact of stress on addiction. *Eur Neuropsychopharmacol* *13*, 435-441.
- Gompf, H. S., Moldavan, M. G., Irwin, R. P., and Allen, C. N. (2005). Nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ) inhibits excitatory and inhibitory synaptic signaling in the suprachiasmatic nucleus (SCN). *Neuroscience* *132*, 955-965.
- Good, M. A., Barnes, P., Staal, V., McGregor, A., and Honey, R. C. (2007). Context- but not familiarity-dependent forms of object recognition are impaired following excitotoxic hippocampal lesions in rats. *Behav Neurosci* *121*, 218-223.
- Gould, T. J., McCarthy, M. M., and Keith, R. A. (2002). MK-801 disrupts acquisition of contextual fear conditioning but enhances memory consolidation of cued fear conditioning. *Behav Pharmacol* *13*, 287-294.
- Graeff, F. G., Guimaraes, F. S., De Andrade, T. G., and Deakin, J. F. (1996). Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. *Pharmacol Biochem Behav* *54*, 129-141.
- 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.
- Grasing, K., Wang, A., and Schlussman, S. (1996). Behavioral measures of anxiety during opiate withdrawal. *Behav Brain Res* *80*, 195-201.

- Grauer, S. M., Tao, R., and Auerbach, S. B. (1992). Morphine induces an increase in extracellular serotonin in the rat diencephalon. *Brain Res* 599, 277-282.
- 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.
- Gray, J. A., and McNaughton, N. (1996). The neuropsychology of anxiety: reprise. *Nebr Symp Motiv* 43, 61-134.
- Green, A. R., Mehan, A. O., Elliott, J. M., O'Shea, E., and Colado, M. I. (2003). The pharmacology and clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy"). *Pharmacol Rev* 55, 463-508.
- Grewal, S. S., Horgan, A. M., York, R. D., Withers, G. S., Banker, G. A., and Stork, P. J. (2000). Neuronal calcium activates a Rap1 and B-Raf signaling pathway via the cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 275, 3722-3728.
- Griebel, G. (1995). 5-Hydroxytryptamine-interacting drugs in animal models of anxiety disorders: more than 30 years of research. *Pharmacol Ther* 65, 319-395.
- Griebel, G., Perrault, G., and Sanger, D. J. (1999). Orphanin FQ, a novel neuropeptide with anti-stress-like activity. *Brain Res* 836, 221-224.
- Grisel, J. E., and Mogil, J. S. (2000). Effects of supraspinal orphanin FQ/nociceptin. *Peptides* 21, 1037-1045.
- Guerrini, R., Calo, G., Rizzi, A., Bianchi, C., Lazarus, L. H., Salvadori, S., Temussi, P. A., and Regoli, D. (1997). Address and message sequences for the nociceptin receptor: a structure-activity study of nociceptin-(1-13)-peptide amide. *J Med Chem* 40, 1789-1793.
- Gunduz, O., Rizzi, A., Baldisserotto, A., Guerrini, R., Spagnolo, B., Gavioli, E. C., Kocsis, L., Magyar, A., Benyhe, S., Borsodi, A., and Calo, G. (2006). In vitro and in vivo pharmacological characterization of the nociceptin/orphanin FQ receptor ligand Ac-RYYRIK-ol. *Eur J Pharmacol* 539, 39-48.
- Gutierrez, R., Leff, P., Romo-Parra, H., Acevedo, R., and Anton, B. (2001). Orphanin-FQ/nociceptin inhibits kindling epileptogenesis and enhances hippocampal feed-forward inhibition. *Neuroscience* 105, 325-333.
- Guzowski, J. F. (2002). Insights into immediate-early gene function in hippocampal memory consolidation using antisense oligonucleotide and fluorescent imaging approaches. *Hippocampus* 12, 86-104.
- Hajilou, B. B., and Done, D. J. (2007). Evidence for a dissociation of structural and semantic knowledge in dementia of the Alzheimer type (DAT). *Neuropsychologia* 45, 810-816.
- Halford, W. P., Gebhardt, B. M., and Carr, D. J. (1995). Functional role and sequence analysis of a lymphocyte orphan opioid receptor. *J Neuroimmunol* 59, 91-101.
- Hallberg, M., and Nyberg, F. (2003). Neuropeptide conversion to bioactive fragments--an important pathway in neuromodulation. *Curr Protein Pept Sci* 4, 31-44.
- Hammond, R. S., Tull, L. E., and Stackman, R. W. (2004). On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem* 82, 26-34.

- Harris, G. C., and Aston-Jones, G. (1993). Beta-adrenergic antagonists attenuate withdrawal anxiety in cocaine- and morphine-dependent rats. *Psychopharmacology (Berl)* *113*, 131-136.
- Harris, G. C., and 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., and Aston-Jones, G. (2003). Altered motivation and learning following opiate withdrawal: evidence for prolonged dysregulation of reward processing. *Neuropsychopharmacology* *28*, 865-871.
- 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.
- Hasselmo, M. E. (2006). The role of acetylcholine in learning and memory. *Curr Opin Neurobiol* *16*, 710-715.
- Heinricher, M. M. (2003). Orphanin FQ/nociceptin: from neural circuitry to behavior. *Life Sci* *73*, 813-822.
- Heinricher, M. M. (2005). Nociceptin/orphanin FQ: pain, stress and neural circuits. *Life Sci* *77*, 3127-3132.
- Higgins, G. A., Grottick, A. J., Ballard, T. M., Richards, J. G., Messer, J., Takeshima, H., Pauly-Evers, M., Jenck, F., Adam, G., and Wichmann, J. (2001). Influence of the selective ORL1 receptor agonist, Ro64-6198, on rodent neurological function. *Neuropharmacology* *41*, 97-107.
- Higgins, G. A., Kew, J. N., Richards, J. G., Takeshima, H., Jenck, F., Adam, G., Wichmann, J., Kemp, J. A., and Grottick, A. J. (2002). A combined pharmacological and genetic approach to investigate the role of orphanin FQ in learning and memory. *Eur J Neurosci* *15*, 911-922.
- Hiramatsu, M., and Inoue, K. (1999a). Effects of nocistatin on nociceptin-induced impairment of learning and memory in mice. *Eur J Pharmacol* *367*, 151-155.
- Hiramatsu, M., and Inoue, K. (1999b). Nociceptin/orphanin FQ and nocistatin on learning and memory impairment induced by scopolamine in mice. *Br J Pharmacol* *127*, 655-660.
- Hiramatsu, M., and Inoue, K. (2000). Improvement by low doses of nociceptin on scopolamine-induced impairment of learning and/or memory. *Eur J Pharmacol* *395*, 149-156.
- Hiramatsu, M., Miwa, M., Hashimoto, K., Kawai, S., and Nomura, N. (2008). Nociceptin/orphanin FQ reverses mecamylamine-induced learning and memory impairment as well as decrease in hippocampal acetylcholine release in the rat. *Brain Res* *1195*, 96-103.
- Hirao, A., Imai, A., Sugie, Y., Yamada, Y., Hayashi, S., and Toide, K. (2008). Pharmacological characterization of the newly synthesized nociceptin/orphanin FQ-receptor agonist 1-[1-(1-methylcyclooctyl)-4-piperidinyl]-2-[(3R)-3-piperidinyl]-1H-benzimidazole as an anxiolytic agent. *J Pharmacol Sci* *106*, 361-368.
- Houshyar, H., Gomez, F., Manalo, S., Bhargava, A., and Dallman, M. F. (2003). Intermittent morphine administration induces dependence and is a chronic stressor in rats. *Neuropsychopharmacology* *28*, 1960-1972.
- Houslay, M. D., and Kolch, W. (2000). Cell-type specific integration of cross-talk between extracellular signal-regulated kinase and cAMP signaling. *Mol Pharmacol* *58*, 659-668.

- Houtani, T., Nishi, M., Takeshima, H., Nukada, T., and Sugimoto, T. (1996). Structure and regional distribution of nociceptin/orphanin FQ precursor. *Biochem Biophys Res Commun* 219, 714-719.
- Houtani, T., Nishi, M., Takeshima, H., Sato, K., Sakuma, S., Kakimoto, S., Ueyama, T., Noda, T., and Sugimoto, T. (2000). Distribution of nociceptin/orphanin FQ precursor protein and receptor in brain and spinal cord: a study using in situ hybridization and X-gal histochemistry in receptor-deficient mice. *J Comp Neurol* 424, 489-508.
- Huff, N. C., and Rudy, J. W. (2004). The amygdala modulates hippocampus-dependent context memory formation and stores cue-shock associations. *Behav Neurosci* 118, 53-62.
- Hughes, J. R., Stead, L. F., and Lancaster, T. (2007). Antidepressants for smoking cessation. *Cochrane Database Syst Rev*, CD000031.
- Hunsaker, M. R., and Kesner, R. P. (2008). Dissociations across the dorsal-ventral axis of CA3 and CA1 for encoding and retrieval of contextual and auditory-cued fear. *Neurobiol Learn Mem* 89, 61-69.
- Hyman, S. E. (2005). Addiction: a disease of learning and memory. *Am J Psychiatry* 162, 1414-1422.
- Igaz, L. M., Winograd, M., Cammarota, M., Izquierdo, L. A., Alonso, M., Izquierdo, I., and Medina, J. H. (2006). Early activation of extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in the hippocampus is required for short-term memory formation of a fear-motivated learning. *Cell Mol Neurobiol* 26, 989-1002.
- Impey, S., Obrietan, K., and Storm, D. R. (1999). Making new connections: role of ERK/MAP kinase signaling in neuronal plasticity. *Neuron* 23, 11-14.
- Inoue, M., Matsunaga, S., Rashid, M. H., Yoshida, A., Mizuno, K., Sakurada, T., Takeshima, H., and Ueda, H. (2001). Pronociceptive effects of nociceptin/orphanin FQ (13-17) at peripheral and spinal level in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 299, 213-219.
- Isiegas, C., McDonough, C., Huang, T., Havekes, R., Fabian, S., Wu, L. J., Xu, H., Zhao, M. G., Kim, J. I., Lee, Y. S., *et al.* (2008). A novel conditional genetic system reveals that increasing neuronal cAMP enhances memory and retrieval. *J Neurosci* 28, 6220-6230.
- Itoh, K., Konya, H., Takai, E., Masuda, H., and Nagai, K. (1999). Modification of acetylcholine release by nociceptin in conscious rat striatum. *Brain Res* 845, 242-245.
- Jarrard, L. E. (1978). Selective hippocampal lesions: differential effects on performance by rats of a spatial task with preoperative versus postoperative training. *J Comp Physiol Psychol* 92, 1119-1127.
- Jay, T. M., and Witter, M. P. (1991). Distribution of hippocampal CA1 and subicular efferents in the prefrontal cortex of the rat studied by means of anterograde transport of Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. *J Comp Neurol* 313, 574-586.
- Jenck, F., Moreau, J. L., Martin, J. R., Kilpatrick, G. J., Reinscheid, R. K., Monsma, F. J., Jr., Nothacker, H. P., and Civelli, O. (1997). Orphanin FQ acts as an anxiolytic to attenuate behavioral responses to stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 14854-14858.
- Jenck, F., Wichmann, J., Dautzenberg, F. M., Moreau, J. L., Ouagazzal, A. M., Martin, J. R., Lundstrom, K., Cesura, A. M., Poli, S. M., Roever, S., *et al.* (2000). A synthetic agonist at the orphanin FQ/nociceptin receptor ORL1: anxiolytic profile in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4938-4943.

- Johnson, E. E., and Connor, M. (2007). Towards a receptor for nocistatin? *Br J Pharmacol* 152, 415-416.
- Jolas, T., Nestler, E. J., and 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.
- Jones, S., and Bonci, A. (2005). Synaptic plasticity and drug addiction. *Curr Opin Pharmacol* 5, 20-25.
- Kalueff, A. V. (2007). Neurobiology of memory and anxiety: from genes to behavior. *Neural Plast* 2007, 78171.
- Kalueff, A. V., and Tuohimaa, P. (2005a). The grooming analysis algorithm discriminates between different levels of anxiety in rats: potential utility for neurobehavioural stress research. *J Neurosci Methods* 143, 169-177.
- Kalueff, A. V., and Tuohimaa, P. (2005b). Mouse grooming microstructure is a reliable anxiety marker bidirectionally sensitive to GABAergic drugs. *Eur J Pharmacol* 508, 147-153.
- Kandel E. R., Schwartz J., Jessell T. (2000) "Principles of Neuroscience"
- Kandel, E. R. (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 294, 1030-1038.
- Karasawa, J., Hashimoto, K., and Chaki, S. (2008). D-Serine and a glycine transporter inhibitor improve MK-801-induced cognitive deficits in a novel object recognition test in rats. *Behav Brain Res* 186, 78-83.
- Kauer, J. A., and Malenka, R. C. (2007). Synaptic plasticity and addiction. *Nat Rev Neurosci* 8, 844-858.
- Kelleher, R. J., 3rd, Govindarajan, A., Jung, H. Y., Kang, H., and Tonegawa, S. (2004). Translational control by MAPK signaling in long-term synaptic plasticity and memory. *Cell* 116, 467-479.
- Kelly, A., Laroche, S., and Davis, S. (2003). Activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in hippocampal circuitry is required for consolidation and reconsolidation of recognition memory. *J Neurosci* 23, 5354-5360.
- Kennedy, N., Foy, K., Sherazi, R., McDonough, M., and McKeon, P. (2007). Long-term social functioning after depression treated by psychiatrists: a review. *Bipolar Disord* 9, 25-37.
- Kennedy, P. J., and Shapiro, M. L. (2004). Retrieving memories via internal context requires the hippocampus. *J Neurosci* 24, 6979-6985.
- Kenny, P. J., Chen, S. A., Kitamura, O., Markou, A., and Koob, G. F. (2006). Conditioned withdrawal drives heroin consumption and decreases reward sensitivity. *J Neurosci* 26, 5894-5900.
- Kest, B., Palmese, C. A., Hopkins, E., Adler, M., and Juni, A. (2001). Assessment of acute and chronic morphine dependence in male and female mice. *Pharmacol Biochem Behav* 70, 149-156.
- Kest, B., Palmese, C. A., Hopkins, E., Adler, M., Juni, A., and 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, 463-469.

- Kew, J. N., and Kemp, J. A. (2005). Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology (Berl)* 179, 4-29.
- Khajehpour, L., Rezayof, A., and Zarrindast, M. R. (2008). Involvement of dorsal hippocampal nicotinic receptors in the effect of morphine on memory retrieval in passive avoidance task. *Eur J Pharmacol* 584, 343-351.
- Kieffer, B. L., Befort, K., Gaveriaux-Ruff, C., and 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, 12048-12052.
- Kim, J. J., and Fanselow, M. S. (1992). Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science* 256, 675-677.
- Kim, J. J., and Jung, M. W. (2006). Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: a critical review. *Neurosci Biobehav Rev* 30, 188-202.
- King, M. A., Rossi, G. C., Chang, A. H., Williams, L., and Pasternak, G. W. (1997). Spinal analgesic activity of orphanin FQ/nociceptin and its fragments. *Neurosci Lett* 223, 113-116.
- Kitanaka, J., Kitanaka, N., and Takemura, M. (2008). Neurochemical consequences of dysphoric state during amphetamine withdrawal in animal models: a review. *Neurochem Res* 33, 204-219.
- Klann, E., and Sweatt, J. D. (2008). Altered protein synthesis is a trigger for long-term memory formation. *Neurobiol Learn Mem* 89, 247-259.
- Kobayashi, K., Ikeda, Y., Haneda, E., and Suzuki, H. (2008). Chronic fluoxetine bidirectionally modulates potentiating effects of serotonin on the hippocampal mossy fiber synaptic transmission. *J Neurosci* 28, 6272-6280.
- Koizumi, M., Midorikawa, N., Takeshima, H., and Murphy, N. P. (2004). Exogenous, but not endogenous nociceptin modulates mesolimbic dopamine release in mice. *J Neurochem* 89, 257-263.
- Kolb B., Whishaw I.Q., (2002) "An introduction to brain and behavior", de Boeck.
- Kompagne, H., Bardos, G., Szenasi, G., Gacsalyi, I., Harsing, L. G., and Levay, G. (2008). Chronic mild stress generates clear depressive but ambiguous anxiety-like behaviour in rats. *Behav Brain Res* 193, 311-314.
- Koob, G. F. (2008). A role for brain stress systems in addiction. *Neuron* 59, 11-34.
- Koob, G. F., and Le Moal, M. (2001). Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology* 24, 97-129.
- Koob, G. F., and Le Moal, M. (2008). Review. Neurobiological mechanisms for opponent motivational processes in addiction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363, 3113-3123.
- Koster, A., Montkowski, A., Schulz, S., Stube, E. M., Knautd, K., Jenck, F., Moreau, J. L., Nothacker, H. P., Civelli, O., and Reinscheid, R. K. (1999). Targeted disruption of the orphanin FQ/nociceptin gene increases stress susceptibility and impairs stress adaptation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10444-10449.
- Kullmann, D. M., and Lamsa, K. P. (2007). Long-term synaptic plasticity in hippocampal interneurons. *Nat Rev Neurosci* 8, 687-699.

- Kumaran, D., and Maguire, E. A. (2007). Which computational mechanisms operate in the hippocampus during novelty detection? *Hippocampus* *17*, 735-748.
- Kushner, S. A., Elgersma, Y., Murphy, G. G., Jaarsma, D., van Woerden, G. M., Hojjati, M. R., Cui, Y., LeBoutillier, J. C., Marrone, D. F., Choi, E. S., *et al.* (2005). Modulation of presynaptic plasticity and learning by the H-ras/extracellular signal-regulated kinase/synapsin I signaling pathway. *J Neurosci* *25*, 9721-9734.
- Kuzmin, A., Sandin, J., Terenius, L., and Ogren, S. O. (2003). Acquisition, expression, and reinstatement of ethanol-induced conditioned place preference in mice: effects of opioid receptor-like 1 receptor agonists and naloxone. *J Pharmacol Exp Ther* *304*, 310-318.
- Kyuhou, S., and Gemba, H. (1999). Injection of orphanin FQ/nociceptin into the periaqueductal gray suppresses the forebrain-elicited vocalization in the guinea pig. *Neurosci Lett* *260*, 113-116.
- Lachowicz, J. E., Shen, Y., Monsma, F. J., Jr., and Sibley, D. R. (1995). Molecular cloning of a novel G protein-coupled receptor related to the opiate receptor family. *J Neurochem* *64*, 34-40.
- Lambert, D. G. (2008). The nociceptin/orphanin FQ receptor: a target with broad therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* *7*, 694-710.
- Landeira-Fernandez, J., DeCola, J. P., Kim, J. J., and Fanselow, M. S. (2006). Immediate shock deficit in fear conditioning: effects of shock manipulations. *Behav Neurosci* *120*, 873-879.
- Lapiz-Bluhm, M. D., Bondi, C. O., Doyen, J., Rodriguez, G. A., Bedard-Arana, T., and Morilak, D. A. (2008). Behavioural assays to model cognitive and affective dimensions of depression and anxiety in rats. *J Neuroendocrinol* *20*, 1115-1137.
- Le Pen, G., Wichmann, J., Moreau, J. L., and Jenck, F. (2002). The orphanin receptor agonist RO 64-6198 does not induce place conditioning in rats. *Neuroreport* *13*, 451-454.
- LeDoux, J. (2003). The emotional brain, fear, and the amygdala. *Cell Mol Neurobiol* *23*, 727-738.
- Lee, A. C., Rahman, S., Hodges, J. R., Sahakian, B. J., and Graham, K. S. (2003). Associative and recognition memory for novel objects in dementia: implications for diagnosis. *Eur J Neurosci* *18*, 1660-1670.
- Leroy, D., Missotten, M., Waltzinger, C., Martin, T., and Scheer, A. (2007). G protein-coupled receptor-mediated ERK1/2 phosphorylation: towards a generic sensor of GPCR activation. *J Recept Signal Transduct Res* *27*, 83-97.
- Lesch, K. P., and Mossner, R. (2006). Inactivation of 5HT transport in mice: modeling altered 5HT homeostasis implicated in emotional dysfunction, affective disorders, and somatic syndromes. *Handb Exp Pharmacol*, 417-456.
- Lewis, M. C., Kerr, K. M., Orr, P. T., and Frick, K. M. (2008). Estradiol-induced enhancement of object memory consolidation involves NMDA receptors and protein kinase A in the dorsal hippocampus of female C57BL/6 mice. *Behav Neurosci* *122*, 716-721.
- Lima, M. S., Reisser, A. A., Soares, B. G., and Farrell, M. (2003). Antidepressants for cocaine dependence. *Cochrane Database Syst Rev*, CD002950.

- Lisman, J. E., and McIntyre, C. C. (2001). Synaptic plasticity: a molecular memory switch. *Curr Biol* 11, R788-791.
- Liu, J., and Schulteis, G. (2004). Brain reward deficits accompany naloxone-precipitated withdrawal from acute opioid dependence. *Pharmacol Biochem Behav* 79, 101-108.
- Lonze, B. E., and Ginty, D. D. (2002). Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35, 605-623.
- Lopes da Silva, F. H., Witter, M. P., Boeijinga, P. H., and Lohman, A. H. (1990). Anatomic organization and physiology of the limbic cortex. *Physiol Rev* 70, 453-511.
- Lou, L. G., Zhang, Z., Ma, L., and Pei, G. (1998). Nociceptin/orphanin FQ activates mitogen-activated protein kinase in Chinese hamster ovary cells expressing opioid receptor-like receptor. *J Neurochem* 70, 1316-1322.
- Lu, L., Su, W. J., Yue, W., Ge, X., Su, F., Pei, G., and Ma, L. (2001). Attenuation of morphine dependence and withdrawal in rats by venlafaxine, a serotonin and noradrenaline reuptake inhibitor. *Life Sci* 69, 37-46.
- MacDonald, J. F., Kotecha, S. A., Lu, W. Y., and Jackson, M. F. (2001). Convergence of PKC-dependent kinase signal cascades on NMDA receptors. *Curr Drug Targets* 2, 299-312.
- Maher, P., Akaishi, T., and Abe, K. (2006). Flavonoid fisetin promotes ERK-dependent long-term potentiation and enhances memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 16568-16573.
- Maldonado, R. (1997). Participation of noradrenergic pathways in the expression of opiate withdrawal: biochemical and pharmacological evidence. *Neurosci Biobehav Rev* 21, 91-104.
- Mamiya, T., Noda, Y., Nishi, M., Takeshima, H., and Nabeshima, T. (1998). Enhancement of spatial attention in nociceptin/orphanin FQ receptor-knockout mice. *Brain Res* 783, 236-240.
- Mamiya, T., Noda, Y., Nishi, M., Takeshima, H., and Nabeshima, T. (1999). Nociceptin system plays a role in the memory retention: involvement of naloxone benzoylhydrazone binding sites. *Neuroreport* 10, 1171-1175.
- Mamiya, T., Yamada, K., Miyamoto, Y., Konig, N., Watanabe, Y., Noda, Y., and Nabeshima, T. (2003). Neuronal mechanism of nociceptin-induced modulation of learning and memory: involvement of N-methyl-D-aspartate receptors. *Mol Psychiatry* 8, 752-765.
- Manabe, T., Noda, Y., Mamiya, T., Katagiri, H., Houtani, T., Nishi, M., Noda, T., Takahashi, T., Sugimoto, T., Nabeshima, T., and Takeshima, H. (1998). Facilitation of long-term potentiation and memory in mice lacking nociceptin receptors. *Nature* 394, 577-581.
- Marti, M., Mela, F., Fantin, M., Zucchini, S., Brown, J. M., Witta, J., Di Benedetto, M., Buzas, B., Reinscheid, R. K., Salvadori, S., *et al.* (2005). Blockade of nociceptin/orphanin FQ transmission attenuates symptoms and neurodegeneration associated with Parkinson's disease. *J Neurosci* 25, 9591-9601.
- Marti, M., Viaro, R., Guerrini, R., Franchi, G., and Morari, M. (2008). Nociceptin/Orphanin FQ Modulates Motor Behavior and Primary Motor Cortex Output Through Receptors Located in Substantia Nigra Reticulata. *Neuropsychopharmacology*.
- Martin, W. R., and Jasinski, D. R. (1969). Physiological parameters of morphine dependence in man--tolerance, early abstinence, protracted abstinence. *J Psychiatr Res* 7, 9-17.

- Massey, P. V., and Bashir, Z. I. (2007). Long-term depression: multiple forms and implications for brain function. *Trends Neurosci* 30, 176-184.
- Matthes, H. W., Maldonado, R., Simonin, F., Valverde, O., Slowe, S., Kitchen, I., Befort, K., Dierich, A., Le Meur, M., Dolle, P., *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.
- Matus-Amat, P., Higgins, E. A., Barrientos, R. M., and Rudy, J. W. (2004). The role of the dorsal hippocampus in the acquisition and retrieval of context memory representations. *J Neurosci* 24, 2431-2439.
- McHugh, T. J., and Tonegawa, S. (2007). Spatial exploration is required for the formation of contextual fear memory. *Behav Neurosci* 121, 335-339.
- McLeod, R. L., Parra, L. E., Mutter, J. C., Erickson, C. H., Carey, G. J., Tulshian, D. B., Fawzi, A. B., Smith-Torhan, A., Egan, R. W., Cuss, F. M., and Hey, J. A. (2001). Nociceptin inhibits cough in the guinea-pig by activation of ORL(1) receptors. *Br J Pharmacol* 132, 1175-1178.
- McNaughton, N., and Corr, P. J. (2004). A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. *Neurosci Biobehav Rev* 28, 285-305.
- Meis, S. (2003). Nociceptin/orphanin FQ: actions within the brain. *Neuroscientist* 9, 158-168.
- Meunier, J. C. (1997). Nociceptin/orphanin FQ and the opioid receptor-like ORL1 receptor. *Eur J Pharmacol* 340, 1-15.
- Meunier, J. C., Mollereau, C., Toll, L., Suaudeau, C., Moisand, C., Alvinerie, P., Butour, J. L., Guillemot, J. C., Ferrara, P., Monsarrat, B., and *et al.* (1995). Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature* 377, 532-535.
- Micheau, J., and Riedel, G. (1999). Protein kinases: which one is the memory molecule? *Cell Mol Life Sci* 55, 534-548.
- Michelsen, K. A., Prickaerts, J., and 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, 233-264.
- Mineur, Y. S., Belzung, C., and Crusio, W. E. (2006). Effects of unpredictable chronic mild stress on anxiety and depression-like behavior in mice. *Behav Brain Res* 175, 43-50.
- Miyashita, T., Kubik, S., Lewandowski, G., and Guzowski, J. F. (2008). Networks of neurons, networks of genes: an integrated view of memory consolidation. *Neurobiol Learn Mem* 89, 269-284.
- Mogil, J. S., Nessim, L. A., and Wilson, S. G. (1999). Strain-dependent effects of supraspinal orphanin FQ/nociceptin on thermal nociceptive sensitivity in mice. *Neurosci Lett* 261, 147-150.
- Mogil, J. S., and Pasternak, G. W. (2001). The molecular and behavioral pharmacology of the orphanin FQ/nociceptin peptide and receptor family. *Pharmacol Rev* 53, 381-415.
- Moles, A., Kieffer, B. L., and D'Amato, F. R. (2004). Deficit in attachment behavior in mice lacking the mu-opioid receptor gene. *Science* 304, 1983-1986.

- Molina, V. A., Heyser, C. J., and Spear, L. P. (1994). Chronic variable stress or chronic morphine facilitates immobility in a forced swim test: reversal by naloxone. *Psychopharmacology (Berl)* *114*, 433-440.
- Mollereau, C., and Mouledous, L. (2000). Tissue distribution of the opioid receptor-like (ORL1) receptor. *Peptides* *21*, 907-917.
- Mollereau, C., Parmentier, M., Mailleux, P., Butour, J. L., Moisand, C., Chalou, P., Caput, D., Vassart, G., and Meunier, J. C. (1994). ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett* *341*, 33-38.
- Mollereau, C., Simons, M. J., Soularue, P., Liners, F., Vassart, G., Meunier, J. C., and Parmentier, M. (1996). Structure, tissue distribution, and chromosomal localization of the prepronociceptin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 8666-8670.
- Montiel, J. L., Cornille, F., Roques, B. P., and Noble, F. (1997). Nociceptin/orphanin FQ metabolism: role of aminopeptidase and endopeptidase 24.15. *J Neurochem* *68*, 354-361.
- Moran, T. D., Abdulla, F. A., and Smith, P. A. (2000). Cellular neurophysiological actions of nociceptin/orphanin FQ. *Peptides* *21*, 969-976.
- Morozov, A., Muzzio, I. A., Bourtchouladze, R., Van-Strien, N., Lapidus, K., Yin, D., Winder, D. G., Adams, J. P., Sweatt, J. D., and Kandel, E. R. (2003). Rap1 couples cAMP signaling to a distinct pool of p42/44MAPK regulating excitability, synaptic plasticity, learning, and memory. *Neuron* *39*, 309-325.
- Morris, R. G., Garrud, P., Rawlins, J. N., and O'Keefe, J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* *297*, 681-683.
- Mueller, D., Perdikaris, D., and Stewart, J. (2002). Persistence and drug-induced reinstatement of a morphine-induced conditioned place preference. *Behav Brain Res* *136*, 389-397.
- Mumby, D. G., Piterkin, P., Lecluse, V., and Lehmann, H. (2007). Perirhinal cortex damage and anterograde object-recognition in rats after long retention intervals. *Behav Brain Res* *185*, 82-87.
- Murphy, N. P., Lee, Y., and Maidment, N. T. (1999). Orphanin FQ/nociceptin blocks acquisition of morphine place preference. *Brain Res* *832*, 168-170.
- Myers, C. E., and Gluck, M. A. (1994). Context, conditioning, and hippocampal rerepresentation in animal learning. *Behav Neurosci* *108*, 835-847.
- Myers, K. M., and Davis, M. (2002). Behavioral and neural analysis of extinction. *Neuron* *36*, 567-584.
- Nabeshima, T., Noda, Y., and Mamiya, T. (1999). The role of nociceptin in cognition. *Brain Res* *848*, 167-173.
- Nagai, T., Takuma, K., Kamei, H., Ito, Y., Nakamichi, N., Ibi, D., Nakanishi, Y., Murai, M., Mizoguchi, H., Nabeshima, T., and Yamada, K. (2007). Dopamine D1 receptors regulate protein synthesis-dependent long-term recognition memory via extracellular signal-regulated kinase 1/2 in the prefrontal cortex. *Learn Mem* *14*, 117-125.
- Nakagawa, T., and Kaneko, S. (2008). Neuropsychotoxicity of abused drugs: molecular and neural mechanisms of neuropsychotoxicity induced by methamphetamine, 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy), and 5-methoxy-N,N-diisopropyltryptamine (foxy). *J Pharmacol Sci* *106*, 2-8.

- Narayanan, S., Lam, H., Carroll, F. I., and Lutfy, K. (2004). Orphanin FQ/nociceptin suppresses motor activity through an action along the mesoaccumbens axis in rats. *J Psychiatry Neurosci* 29, 116-123.
- Nazzaro, C., Rizzi, A., Salvadori, S., Guerrini, R., Regoli, D., Zeilhofer, H. U., and Calo, G. (2007). UFP-101 antagonizes the spinal antinociceptive effects of nociceptin/orphanin FQ: behavioral and electrophysiological studies in mice. *Peptides* 28, 663-669.
- Neal, C. R., Jr., Mansour, A., Reinscheid, R., Nothacker, H. P., Civelli, O., Akil, H., and Watson, S. J., Jr. (1999a). Opioid receptor-like (ORL1) receptor distribution in the rat central nervous system: comparison of ORL1 receptor mRNA expression with (125)I-[(14)Tyr]-orphanin FQ binding. *J Comp Neurol* 412, 563-605.
- Neal, C. R., Jr., Mansour, A., Reinscheid, R., Nothacker, H. P., Civelli, O., and Watson, S. J., Jr. (1999b). Localization of orphanin FQ (nociceptin) peptide and messenger RNA in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol* 406, 503-547.
- Nestler, E. J. (2001). Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat Rev Neurosci* 2, 119-128.
- New, D. C., and Wong, Y. H. (2002). The ORL1 receptor: molecular pharmacology and signalling mechanisms. *Neurosignals* 11, 197-212.
- Nicholls, R. E., Alarcon, J. M., Malleret, G., Carroll, R. C., Grody, M., Vronskaya, S., and Kandel, E. R. (2008). Transgenic mice lacking NMDAR-dependent LTD exhibit deficits in behavioral flexibility. *Neuron* 58, 104-117.
- Nicolas, L. B., Kolb, Y., and Prinssen, E. P. (2006). A combined marble burying-locomotor activity test in mice: a practical screening test with sensitivity to different classes of anxiolytics and antidepressants. *Eur J Pharmacol* 547, 106-115.
- Niesink, R. J., and van Ree, J. M. (1982). Short-term isolation increases social interactions of male rats: a parametric analysis. *Physiol Behav* 29, 819-825.
- Nilsson, M., Hansson, S., Carlsson, A., and Carlsson, M. L. (2007). Differential effects of the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801 on different stages of object recognition memory in mice. *Neuroscience* 149, 123-130.
- Nishi, M., Houtani, T., Noda, Y., Mamiya, T., Sato, K., Doi, T., Kuno, J., Takeshima, H., Nukada, T., Nabeshima, T., *et al.* (1997). Unrestrained nociceptive response and dysregulation of hearing ability in mice lacking the nociceptin/orphanin FQ receptor. *Embo J* 16, 1858-1864.
- Noble, F., and Roques, B. P. (1997). Association of aminopeptidase N and endopeptidase 24.15 inhibitors potentiate behavioral effects mediated by nociceptin/orphanin FQ in mice. *FEBS Lett* 401, 227-229.
- Nocjar, C., and Panksepp, J. (2007). Prior morphine experience induces long-term increases in social interest and in appetitive behavior for natural reward. *Behav Brain Res* 181, 191-199.
- Nothacker, H. P., Reinscheid, R. K., Mansour, A., Henningsen, R. A., Ardati, A., Monsma, F. J., Jr., Watson, S. J., and Civelli, O. (1996). Primary structure and tissue distribution of the orphanin FQ precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8677-8682.
- Nunes, E. V., and Levin, F. R. (2006). Treating depression in substance abusers. *Curr Psychiatry Rep* 8, 363-370.

- Nutt, D. J. (2008). Relationship of neurotransmitters to the symptoms of major depressive disorder. *J Clin Psychiatry* *69 Suppl E1*, 4-7.
- O'Brien, J., and Sutherland, R. J. (2007). Evidence for episodic memory in a pavlovian conditioning procedure in rats. *Hippocampus* *17*, 1149-1152.
- O'Keefe, J., and Dostrovsky, J. (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res* *34*, 171-175.
- Okawa, H., Kudo, M., Kudo, T., Guerrini, R., Lambert, D. G., Kushikata, T., Yoshida, H., and Matsuki, A. (2001). Effects of nociceptinNH₂ and [Nphe¹]nociceptin(1-13)NH₂ on rat brain noradrenaline release in vivo and in vitro. *Neurosci Lett* *303*, 173-176.
- Okuda-Ashitaka, E., and Ito, S. (2000). Nocistatin: a novel neuropeptide encoded by the gene for the nociceptin/orphanin FQ precursor. *Peptides* *21*, 1101-1109.
- Olson, V. G., Heusner, C. L., Bland, R. J., During, M. J., Weinschenker, D., and Palmiter, R. D. (2006). Role of noradrenergic signaling by the nucleus tractus solitarius in mediating opiate reward. *Science* *311*, 1017-1020.
- Osinski, M. A., and Brown, D. R. (2000). Orphanin FQ/nociceptin: a novel neuromodulator of gastrointestinal function? *Peptides* *21*, 999-1005.
- Ouagazzal, A. M., Moreau, J. L., Pauly-Evers, M., and Jenck, F. (2003). Impact of environmental housing conditions on the emotional responses of mice deficient for nociceptin/orphanin FQ peptide precursor gene. *Behav Brain Res* *144*, 111-117.
- Packard, M. G., and Knowlton, B. J. (2002). Learning and memory functions of the Basal Ganglia. *Annu Rev Neurosci* *25*, 563-593.
- 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.
- Paoletti, P., and Neyton, J. (2007). NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol* *7*, 39-47.
- Papaleo, F., and Contarino, A. (2006). Gender- and morphine dose-linked expression of spontaneous somatic opiate withdrawal in mice. *Behav Brain Res* *170*, 110-118.
- Pape, H. C., and Stork, O. (2003). Genes and mechanisms in the amygdala involved in the formation of fear memory. *Ann N Y Acad Sci* *985*, 92-105.
- Pare, D., Quirk, G. J., and Ledoux, J. E. (2004). New vistas on amygdala networks in conditioned fear. *J Neurophysiol* *92*, 1-9.
- Pejchal, T., Foley, M. A., Kosofsky, B. E., and Waeber, C. (2002). Chronic fluoxetine treatment selectively uncouples raphe 5-HT(1A) receptors as measured by [(35)S]-GTP gamma S autoradiography. *Br J Pharmacol* *135*, 1115-1122.
- Peles, E., Schreiber, S., Naumovsky, Y., and Adelson, M. (2007). Depression in methadone maintenance treatment patients: rate and risk factors. *J Affect Disord* *99*, 213-220.

- Peluso, J., LaForge, K. S., Matthes, H. W., Kreek, M. J., Kieffer, B. L., and Gaveriaux-Ruff, C. (1998). Distribution of nociceptin/orphanin FQ receptor transcript in human central nervous system and immune cells. *J Neuroimmunol* *81*, 184-192.
- Peregud, D. I., Vorontsova, O. N., Yakovlev, A. A., Panchenko, L. F., and 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*, 443-448.
- Pettersson, L. M., Sundler, F., and Danielsen, N. (2002). Expression of orphanin FQ/nociceptin and its receptor in rat peripheral ganglia and spinal cord. *Brain Res* *945*, 266-275.
- Phelps, E. A., and LeDoux, J. E. (2005). Contributions of the amygdala to emotion processing: from animal models to human behavior. *Neuron* *48*, 175-187.
- Phillips, R. G., and LeDoux, J. E. (1992). Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* *106*, 274-285.
- Pitsikas, N., Boultaidakis, A., and Sakellaridis, N. (2008). Effects of sub-anesthetic doses of ketamine on rats' spatial and non-spatial recognition memory. *Neuroscience* *154*, 454-460.
- Pittenger, C., Huang, Y. Y., Paletzki, R. F., Bourtchouladze, R., Scanlin, H., Vronskaya, S., and Kandel, E. R. (2002). Reversible inhibition of CREB/ATF transcription factors in region CA1 of the dorsal hippocampus disrupts hippocampus-dependent spatial memory. *Neuron* *34*, 447-462.
- Poirier, R., Jacquot, S., Vaillend, C., Southiphong, A. A., Libbey, M., Davis, S., Laroche, S., Hanauer, A., Welzl, H., Lipp, H. P., and Wolfer, D. P. (2007). Deletion of the Coffin-Lowry syndrome gene *Rsk2* in mice is associated with impaired spatial learning and reduced control of exploratory behavior. *Behav Genet* *37*, 31-50.
- Ponnusamy, R., Poulos, A. M., and Fanselow, M. S. (2007). Amygdala-dependent and amygdala-independent pathways for contextual fear conditioning. *Neuroscience* *147*, 919-927.
- Porsolt, R. D., Bertin, A., and Jalfre, M. (1977). Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther* *229*, 327-336.
- Przewlocki, R. (2004). Opioid abuse and brain gene expression. *Eur J Pharmacol* *500*, 331-349.
- Quevedo, J., Vianna, M. R., Martins, M. R., Barichello, T., Medina, J. H., Roesler, R., and Izquierdo, I. (2004). Protein synthesis, PKA, and MAP kinase are differentially involved in short- and long-term memory in rats. *Behav Brain Res* *154*, 339-343.
- Quinn, J. J., Ma, Q. D., Tinsley, M. R., Koch, C., and Fanselow, M. S. (2008). Inverse temporal contributions of the dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex to the expression of long-term fear memories. *Learn Mem* *15*, 368-372.
- Rafieian-Kopaei, M., Gray, A. M., Spencer, P. S., and Sewell, R. D. (1995). Contrasting actions of acute or chronic paroxetine and fluvoxamine on morphine withdrawal-induced place conditioning. *Eur J Pharmacol* *275*, 185-189.
- Ranganath, C., and Rainer, G. (2003). Neural mechanisms for detecting and remembering novel events. *Nat Rev Neurosci* *4*, 193-202.

- Raymond, J. R., Mukhin, Y. V., Gettys, T. W., and Garnovskaya, M. N. (1999). The recombinant 5-HT_{1A} receptor: G protein coupling and signalling pathways. *Br J Pharmacol* *127*, 1751-1764.
- Redrobe, J. P., Calo, G., Guerrini, R., Regoli, D., and Quirion, R. (2000). [Nphe(1)]-Nociceptin (1-13)-NH(2), a nociceptin receptor antagonist, reverses nociceptin-induced spatial memory impairments in the Morris water maze task in rats. *Br J Pharmacol* *131*, 1379-1384.
- Redrobe, J. P., Calo, G., Regoli, D., and Quirion, R. (2002). Nociceptin receptor antagonists display antidepressant-like properties in the mouse forced swimming test. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* *365*, 164-167.
- Reinscheid, R. K., Nothacker, H. P., Bourson, A., Ardati, A., Henningsen, R. A., Bunzow, J. R., Grandy, D. K., Langen, H., Monsma, F. J., Jr., and Civelli, O. (1995). Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. *Science* *270*, 792-794.
- Reiss, D., Wichmann, J., Tekeshima, H., Kieffer, B. L., and Ouagazzal, A. M. (2008). Effects of nociceptin/orphanin FQ receptor (NOP) agonist, Ro64-6198, on reactivity to acute pain in mice: comparison to morphine. *Eur J Pharmacol* *579*, 141-148.
- Renard, C. E., Dailly, E., David, D. J., Hascoet, M., and Bourin, M. (2003). Monoamine metabolism changes following the mouse forced swimming test but not the tail suspension test. *Fundam Clin Pharmacol* *17*, 449-455.
- Riedel, G., Platt, B., and Micheau, J. (2003). Glutamate receptor function in learning and memory. *Behav Brain Res* *140*, 1-47.
- Riedl, M., Shuster, S., Vulchanova, L., Wang, J., Loh, H. H., and Elde, R. (1996). Orphanin FQ/nociceptin-immunoreactive nerve fibers parallel those containing endogenous opioids in rat spinal cord. *Neuroreport* *7*, 1369-1372.
- Ring, R. H., Alder, J., Fennell, M., Kouranova, E., Black, I. B., and Thakker-Varia, S. (2006). Transcriptional profiling of brain-derived-neurotrophic factor-induced neuronal plasticity: a novel role for nociceptin in hippocampal neurite outgrowth. *J Neurobiol* *66*, 361-377.
- Rizzi, A., Marzola, G., Bigoni, R., Guerrini, R., Salvadori, S., Mogil, J. S., Regoli, D., and Calo, G. (2001). Endogenous nociceptin signaling and stress-induced analgesia. *Neuroreport* *12*, 3009-3013.
- Rizzi, A., Nazzaro, C., Marzola, G. G., Zucchini, S., Trapella, C., Guerrini, R., Zeilhofer, H. U., Regoli, D., and Calo, G. (2006). Endogenous nociceptin/orphanin FQ signalling produces opposite spinal antinociceptive and supraspinal pronociceptive effects in the mouse formalin test: pharmacological and genetic evidences. *Pain* *124*, 100-108.
- Rizzi, A., Spagnolo, B., Wainford, R. D., Fischetti, C., Guerrini, R., Marzola, G., Baldisserotto, A., Salvadori, S., Regoli, D., Kapusta, D. R., and Calo, G. (2007). In vitro and in vivo studies on UFP-112, a novel potent and long lasting agonist selective for the nociceptin/orphanin FQ receptor. *Peptides* *28*, 1240-1251.
- Roberto, M., and Siggins, G. R. (2006). Nociceptin/orphanin FQ presynaptically decreases GABAergic transmission and blocks the ethanol-induced increase of GABA release in central amygdala. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 9715-9720.
- Roberts, W. A., Feeney, M. C., Macpherson, K., Petter, M., McMillan, N., and Musolino, E. (2008). Episodic-like memory in rats: is it based on when or how long ago? *Science* *320*, 113-115.

- Robinson, T. E., and Berridge, K. C. (1993). The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Brain Res Rev* 18, 247-291.
- Robinson, T. E., and Berridge, K. C. (2001). Incentive-sensitization and addiction. *Addiction* 96, 103-114.
- Rodi, D., Zucchini, S., Simonato, M., Cifani, C., Massi, M., and Polidori, C. (2008). Functional antagonism between nociceptin/orphanin FQ (N/OFO) and corticotropin-releasing factor (CRF) in the rat brain: evidence for involvement of the bed nucleus of the stria terminalis. *Psychopharmacology (Berl)* 196, 523-531.
- Rodrigues, S. M., Schafe, G. E., and LeDoux, J. E. (2004). Molecular mechanisms underlying emotional learning and memory in the lateral amygdala. *Neuron* 44, 75-91.
- Roesler, R., Reolon, G. K., Luft, T., Martins, M. R., Schroder, N., Vianna, M. R., and Quevedo, J. (2005). NMDA receptors mediate consolidation of contextual memory in the hippocampus after context preexposure. *Neurochem Res* 30, 1407-1411.
- Roosendaal, B., Lengvilas, R., McGaugh, J. L., Civelli, O., and Reinscheid, R. K. (2007). Orphanin FQ/nociceptin interacts with the basolateral amygdala noradrenergic system in memory consolidation. *Learn Mem* 14, 29-35.
- Rosenbaum, J. F., Fava, M., Hoog, S. L., Ascroft, R. C., and Krebs, W. B. (1998). Selective serotonin reuptake inhibitor discontinuation syndrome: a randomized clinical trial. *Biol Psychiatry* 44, 77-87.
- Ross, J., and Armstead, W. M. (2005). NOC/oFQ activates ERK and JNK but not p38 MAPK to impair prostaglandin cerebrovasodilation after brain injury. *Brain Res* 1054, 95-102.
- Rossi, G. C., Leventhal, L., Bolan, E., and Pasternak, G. W. (1997). Pharmacological characterization of orphanin FQ/nociceptin and its fragments. *J Pharmacol Exp Ther* 282, 858-865.
- Rossi, G. C., Mathis, J. P., and Pasternak, G. W. (1998). Analgesic activity of orphanin FQ2, murine prepro-orphanin FQ141-157 in mice. *Neuroreport* 9, 1165-1168.
- Rounsaville, B. J., Weissman, M. M., Crits-Christoph, K., Wilber, C., and Kleber, H. (1982). Diagnosis and symptoms of depression in opiate addicts. Course and relationship to treatment outcome. *Arch Gen Psychiatry* 39, 151-156.
- Rudy, J. W., Barrientos, R. M., and O'Reilly, R. C. (2002). Hippocampal formation supports conditioning to memory of a context. *Behav Neurosci* 116, 530-538.
- Rudy, J. W., Huff, N. C., and Matus-Amat, P. (2004). Understanding contextual fear conditioning: insights from a two-process model. *Neurosci Biobehav Rev* 28, 675-685.
- Rudy, J. W., and O'Reilly, R. C. (1999). Contextual fear conditioning, conjunctive representations, pattern completion, and the hippocampus. *Behav Neurosci* 113, 867-880.
- Rudy, J. W., and O'Reilly, R. C. (2001). Conjunctive representations, the hippocampus, and contextual fear conditioning. *Cogn Affect Behav Neurosci* 1, 66-82.
- Rudy, J. W., and Sutherland, R. J. (1989). The hippocampal formation is necessary for rats to learn and remember configural discriminations. *Behav Brain Res* 34, 97-109.

- Rudy, J. W., and Sutherland, R. J. (1995). Configural association theory and the hippocampal formation: an appraisal and reconfiguration. *Hippocampus* 5, 375-389.
- Ruhe, H. G., Mason, N. S., and 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, 331-359.
- Sakoori, K., and Murphy, N. P. (2004). Central administration of nociceptin/orphanin FQ blocks the acquisition of conditioned place preference to morphine and cocaine, but not conditioned place aversion to naloxone in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 172, 129-136.
- Sakoori, K., and 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.
- Sakurada, C., Sakurada, S., Orito, T., Tan-No, K., and Sakurada, T. (2002). Degradation of nociceptin (orphanin FQ) by mouse spinal cord synaptic membranes is triggered by endopeptidase-24.11: an in vitro and in vivo study. *Biochem Pharmacol* 64, 1293-1303.
- Samuels, I. S., Karlo, J. C., Faruzzi, A. N., Pickering, K., Herrup, K., Sweatt, J. D., Saitta, S. C., and Landreth, G. E. (2008). Deletion of ERK2 mitogen-activated protein kinase identifies its key roles in cortical neurogenesis and cognitive function. *J Neurosci* 28, 6983-6995.
- Sananbenesi, F., Fischer, A., Schrick, C., Spiess, J., and Radulovic, J. (2002). Phosphorylation of hippocampal Erk-1/2, Elk-1, and p90-Rsk-1 during contextual fear conditioning: interactions between Erk-1/2 and Elk-1. *Mol Cell Neurosci* 21, 463-476.
- Sandin, J., Georgieva, J., Schott, P. A., Ogren, S. O., and Terenius, L. (1997). Nociceptin/orphanin FQ microinjected into hippocampus impairs spatial learning in rats. *Eur J Neurosci* 9, 194-197.
- Sandin, J., Georgieva, J., Silberring, J., and Terenius, L. (1999). In vivo metabolism of nociceptin/orphanin FQ in rat hippocampus. *Neuroreport* 10, 71-76.
- Sandin, J., Ogren, S. O., and Terenius, L. (2004). Nociceptin/orphanin FQ modulates spatial learning via ORL-1 receptors in the dorsal hippocampus of the rat. *Brain Res* 997, 222-233.
- Saporito, M. S., Hudkins, R. L., and Maroney, A. C. (2002). Discovery of CEP-1347/KT-7515, an inhibitor of the JNK/SAPK pathway for the treatment of neurodegenerative diseases. *Prog Med Chem* 40, 23-62.
- Satel, S. L., Kosten, T. R., Schuckit, M. A., and Fischman, M. W. (1993). Should protracted withdrawal from drugs be included in DSM-IV? *Am J Psychiatry* 150, 695-704.
- Satoh, Y., Endo, S., Ikeda, T., Yamada, K., Ito, M., Kuroki, M., Hiramoto, T., Imamura, O., Kobayashi, Y., Watanabe, Y., *et al.* (2007). Extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2) knockdown mice show deficits in long-term memory; ERK2 has a specific function in learning and memory. *J Neurosci* 27, 10765-10776.
- Schafe, G. E., Atkins, C. M., Swank, M. W., Bauer, E. P., Sweatt, J. D., and LeDoux, J. E. (2000). Activation of ERK/MAP kinase in the amygdala is required for memory consolidation of pavlovian fear conditioning. *J Neurosci* 20, 8177-8187.
- Schafe, G. E., Doyere, V., and LeDoux, J. E. (2005). Tracking the fear engram: the lateral amygdala is an essential locus of fear memory storage. *J Neurosci* 25, 10010-10014.

- Scherrer, G., Tryoen-Toth, P., Filliol, D., Matifas, A., Laustriat, D., Cao, Y. Q., Basbaum, A. I., Dierich, A., Vonesh, J. L., Gaveriaux-Ruff, C., and Kieffer, B. L. (2006). Knockin mice expressing fluorescent delta-opioid receptors uncover G protein-coupled receptor dynamics in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 9691-9696.
- Schlicker, E., and Morari, M. (2000). Nociceptin/orphanin FQ and neurotransmitter release in the central nervous system. *Peptides* *21*, 1023-1029.
- Schrick, C., Fischer, A., Srivastava, D. P., Tronson, N. C., Penzes, P., and Radulovic, J. (2007). N-cadherin regulates cytoskeletally associated IQGAP1/ERK signaling and memory formation. *Neuron* *55*, 786-798.
- Schulteis, G., Heyser, C. J., and Koob, G. F. (1997). Opiate withdrawal signs precipitated by naloxone following a single exposure to morphine: potentiation with a second morphine exposure. *Psychopharmacology (Berl)* *129*, 56-65.
- Schulteis, G., Liu, J., Amitai, N., and Tzeng, S. (2005). Context- and cue-conditioned potentiation of acute morphine dependence and withdrawal. *Pharmacol Biochem Behav* *82*, 82-89.
- Schulteis, G., Stinus, L., Risbrough, V. B., and Koob, G. F. (1998). Clonidine blocks acquisition but not expression of conditioned opiate withdrawal in rats. *Neuropsychopharmacology* *19*, 406-416.
- Scoville, W. B., and Milner, B. (2000). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. 1957. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* *12*, 103-113.
- Selcher, J. C., Nekrasova, T., Paylor, R., Landreth, G. E., and Sweatt, J. D. (2001). Mice lacking the ERK1 isoform of MAP kinase are unimpaired in emotional learning. *Learn Mem* *8*, 11-19.
- Shalin, S. C., Hernandez, C. M., Dougherty, M. K., Morrison, D. K., and Sweatt, J. D. (2006). Kinase suppressor of Ras1 compartmentalizes hippocampal signal transduction and subserves synaptic plasticity and memory formation. *Neuron* *50*, 765-779.
- Shane, R., Lazar, D. A., Rossi, G. C., Pasternak, G. W., and Bodnar, R. J. (2001). Analgesia elicited by OFQ/nociceptin and its fragments from the amygdala in rats. *Brain Res* *907*, 109-116.
- Shapiro, M. L., and Eichenbaum, H. (1999). Hippocampus as a memory map: synaptic plasticity and memory encoding by hippocampal neurons. *Hippocampus* *9*, 365-384.
- Shi, J., Zhao, L. Y., Epstein, D. H., Zhang, X. L., and 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*, 141-145.
- Shimizu, E., Tang, Y. P., Rampon, C., and Tsien, J. Z. (2000). NMDA receptor-dependent synaptic reinforcement as a crucial process for memory consolidation. *Science* *290*, 1170-1174.
- Shimohira, I., Tokuyama, S., Himeno, A., Niwa, M., and Ueda, H. (1997). Characterization of nociceptin-stimulated in situ [³⁵S]GTPgammaS binding in comparison with opioid agonist-stimulated ones in brain regions of the mice. *Neurosci Lett* *237*, 113-116.
- Shinkai, H., Ito, T., Iida, T., Kitao, Y., Yamada, H., and Uchida, I. (2000). 4-Aminoquinolines: novel nociceptin antagonists with analgesic activity. *J Med Chem* *43*, 4667-4677.

- Shoblock, J. R. (2007). The pharmacology of Ro 64-6198, a systemically active, nonpeptide NOP receptor (opiate receptor-like 1, ORL-1) agonist with diverse preclinical therapeutic activity. *CNS Drug Rev* 13, 107-136.
- Shoblock, J. R., Wichmann, J., and Maidment, N. T. (2005). The effect of a systemically active ORL-1 agonist, Ro 64-6198, on the acquisition, expression, extinction, and reinstatement of morphine conditioned place preference. *Neuropharmacology* 49, 439-446.
- Sigurdsson, T., Doyere, V., Cain, C. K., and LeDoux, J. E. (2007). Long-term potentiation in the amygdala: a cellular mechanism of fear learning and memory. *Neuropharmacology* 52, 215-227.
- Silva, A. J. (2003). Molecular and cellular cognitive studies of the role of synaptic plasticity in memory. *J Neurobiol* 54, 224-237.
- Silva, A. J., Kogan, J. H., Frankland, P. W., and Kida, S. (1998). CREB and memory. *Annu Rev Neurosci* 21, 127-148.
- Sim-Selley, L. J., Vogt, L. J., Childers, S. R., and Vogt, B. A. (2003). Distribution of ORL-1 receptor binding and receptor-activated G-proteins in rat forebrain and their experimental localization in anterior cingulate cortex. *Neuropharmacology* 45, 220-230.
- Sim, L. J., and Childers, S. R. (1997). Anatomical distribution of mu, delta, and kappa opioid- and nociceptin/orphanin FQ-stimulated [³⁵S]guanylyl-5'-O-(gamma-thio)-triphosphate binding in guinea pig brain. *J Comp Neurol* 386, 562-572.
- Simmons, M. L., and Chavkin, C. (1996). Endogenous opioid regulation of hippocampal function. *Int Rev Neurobiol* 39, 145-196.
- Singh, V. P., Jain, N. K., and Kulkarni, S. K. (2003). Fluoxetine suppresses morphine tolerance and dependence: modulation of NO-cGMP/DA/serotonergic pathways. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 25, 273-280.
- Sinha, R. (2007). The role of stress in addiction relapse. *Curr Psychiatry Rep* 9, 388-395.
- Smith, D. M., and Mizumori, S. J. (2006). Hippocampal place cells, context, and episodic memory. *Hippocampus* 16, 716-729.
- Smith, E. E., and Grossman, M. (2008). Multiple systems of category learning. *Neurosci Biobehav Rev* 32, 249-264.
- Smith, R. J., and 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.
- Smits, S. E. (1975). Quantitation of physical dependence in mice by naloxone-precipitated jumping after a single dose of morphine. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 10, 651-661.
- Spagnolo, B., Carra, G., Fantin, M., Fischetti, C., Hebbes, C., McDonald, J., Barnes, T. A., Rizzi, A., Trapella, C., Fanton, G., *et al.* (2007). Pharmacological characterization of the nociceptin/orphanin FQ receptor antagonist SB-612111 [(-)-cis-1-methyl-7-[[4-(2,6-dichlorophenyl)piperidin-1-yl]methyl]-6,7,8,9-tetrahydro-5H-benzocyclohepten-5-ol]: in vitro studies. *J Pharmacol Exp Ther* 321, 961-967.
- Spampinato, S., Baiula, M., and Calienni, M. (2007). Agonist-regulated internalization and desensitization of the human nociceptin receptor expressed in CHO cells. *Curr Drug Targets* 8, 137-146.

- Squire, L. R. (1986). Mechanisms of memory. *Science* 232, 1612-1619.
- Squire, L. R. (2004). Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiol Learn Mem* 82, 171-177.
- Squire, L. R., Wixted, J. T., and Clark, R. E. (2007). Recognition memory and the medial temporal lobe: a new perspective. *Nat Rev Neurosci* 8, 872-883.
- Stahl, S. M. (1998). Mechanism of action of serotonin selective reuptake inhibitors. Serotonin receptors and pathways mediate therapeutic effects and side effects. *J Affect Disord* 51, 215-235.
- Stanford, S. C. (1996). Prozac: panacea or puzzle? *Trends Pharmacol Sci* 17, 150-154.
- Steward, O., Huang, F., and Guzowski, J. F. (2007). A form of perforant path LTP can occur without ERK1/2 phosphorylation or immediate early gene induction. *Learn Mem* 14, 433-445.
- Stiedl, O., Birkenfeld, K., Palve, M., and Spiess, J. (2000). Impairment of conditioned contextual fear of C57BL/6J mice by intracerebral injections of the NMDA receptor antagonist APV. *Behav Brain Res* 116, 157-168.
- Stinus, L., Caille, S., and Koob, G. F. (2000). Opiate withdrawal-induced place aversion lasts for up to 16 weeks. *Psychopharmacology (Berl)* 149, 115-120.
- Stinus, L., Robert, C., Karasinski, P., and Limoge, A. (1998). Continuous quantitative monitoring of spontaneous opiate withdrawal: locomotor activity and sleep disorders. *Pharmacol Biochem Behav* 59, 83-89.
- Stote, D. L., and Fanselow, M. S. (2004). NMDA receptor modulation of incidental learning in Pavlovian context conditioning. *Behav Neurosci* 118, 253-257.
- Sudakov, S. K., Rusakova, I. V., Trigub, M. M., Kudrin, V. S., and Klodt, P. M. (2007). Self-administration of morphine by rats causes monoamine release in the anterior cingulate cortex. *Bull Exp Biol Med* 144, 210-213.
- Sukhotina, I. A. (2001). Morphine withdrawal-facilitated aggression is attenuated by morphine-conditioned stimuli. *Pharmacol Biochem Behav* 68, 93-98.
- Sutherland, R. J., O'Brien, J., and Lehmann, H. (2008). Absence of systems consolidation of fear memories after dorsal, ventral, or complete hippocampal damage. *Hippocampus* 18, 710-718.
- Sutherland, R. J., Whishaw, I. Q., and Kolb, B. (1983). A behavioural analysis of spatial localization following electrolytic, kainate- or colchicine-induced damage to the hippocampal formation in the rat. *Behav Brain Res* 7, 133-153.
- Sweatt, J. D. (2004). Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol* 14, 311-317.
- 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.
- Tao, R., Ma, Z., and 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, 481-488.

- Tao, R., Ma, Z., Thakkar, M. M., McCarley, R. W., and Auerbach, S. B. (2007). Nociceptin/orphanin FQ decreases serotonin efflux in the rat brain but in contrast to a kappa-opioid has no antagonistic effect on mu-opioid-induced increases in serotonin efflux. *Neuroscience* *147*, 106-116.
- Taverna, F. A., Georgiou, J., McDonald, R. J., Hong, N. S., Kraev, A., Salter, M. W., Takeshima, H., Muller, R. U., and Roder, J. C. (2005). Defective place cell activity in nociceptin receptor knockout mice with elevated NMDA receptor-dependent long-term potentiation. *J Physiol* *565*, 579-591.
- Taylor, C., Fricker, A. D., Devi, L. A., and Gomes, I. (2005). Mechanisms of action of antidepressants: from neurotransmitter systems to signaling pathways. *Cell Signal* *17*, 549-557.
- Thomas, G. M., and Huganir, R. L. (2004). MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* *5*, 173-183.
- Thompson, M. R., Li, K. M., Clemens, K. J., Gurtman, C. G., Hunt, G. E., Cornish, J. L., and McGregor, I. S. (2004). Chronic fluoxetine treatment partly attenuates the long-term anxiety and depressive symptoms induced by MDMA ('Ecstasy') in rats. *Neuropsychopharmacology* *29*, 694-704.
- Tian, J. H., Zhang, W., Fang, Y., Xu, W., Grandy, D. K., and Han, J. S. (1998). Endogenous orphanin FQ: evidence for a role in the modulation of electroacupuncture analgesia and the development of tolerance to analgesia produced by morphine and electroacupuncture. *Br J Pharmacol* *124*, 21-26.
- Trifilieff, P., Calandreau, L., Herry, C., Mons, N., and Micheau, J. (2007). Biphasic ERK1/2 activation in both the hippocampus and amygdala may reveal a system consolidation of contextual fear memory. *Neurobiol Learn Mem* *88*, 424-434.
- Trifilieff, P., Herry, C., Vanhoutte, P., Caboche, J., Desmedt, A., Riedel, G., Mons, N., and Micheau, J. (2006). Foreground contextual fear memory consolidation requires two independent phases of hippocampal ERK/CREB activation. *Learn Mem* *13*, 349-358.
- Tse, W. S., and Bond, A. J. (2004). The impact of depression on social skills. *J Nerv Ment Dis* *192*, 260-268.
- Tsien, J. Z., Huerta, P. T., and Tonegawa, S. (1996). The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* *87*, 1327-1338.
- Uchiyama, H., Toda, A., Hiranita, T., Watanabe, S., and Eyanagi, R. (2008). Role of amygdaloid nuclei in the anxiolytic-like effect of nociceptin/orphanin FQ in rats. *Neurosci Lett* *431*, 66-70.
- Uezu, K., Sano, A., Sei, H., Toida, K., Houtani, T., Sugimoto, T., Suzuki-Yamamoto, T., Takeshima, H., Ishimura, K., and Morita, Y. (2005). Enhanced hippocampal acetylcholine release in nociceptin-receptor knockout mice. *Brain Res* *1050*, 118-123.
- Ungar, G., and OcegüeraNavarro, C. (1965). Transfer of habituation by material extracted from brain. *Nature* *207*, 301-302.
- Valjent, E., Aubier, B., Corbille, A. G., Brami-Cherrier, K., Caboche, J., Topilko, P., Girault, J. A., and Herve, D. (2006). Plasticity-associated gene *Krox24/Zif268* is required for long-lasting behavioral effects of cocaine. *J Neurosci* *26*, 4956-4960.

- Valjent, E., Caboche, J., and Vanhoutte, P. (2001). Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase induced gene regulation in brain: a molecular substrate for learning and memory? *Mol Neurobiol* 23, 83-99.
- Valverde, O., Tzavara, E., Hanoune, J., Roques, B. P., and Maldonado, R. (1996). Protein kinases in the rat nucleus accumbens are involved in the aversive component of opiate withdrawal. *Eur J Neurosci* 8, 2671-2678.
- Vanderschuren, L. J., Niesink, R. J., and Van Ree, J. M. (1997). The neurobiology of social play behavior in rats. *Neurosci Biobehav Rev* 21, 309-326.
- Vanhose, A. M., Emery, M., Jimenez, L., and Winder, D. G. (2002). ERK activation by G-protein-coupled receptors in mouse brain is receptor identity-specific. *J Biol Chem* 277, 9049-9053.
- Varty, G. B., Hyde, L. A., Hodgson, R. A., Lu, S. X., McCool, M. F., Kazdoba, T. M., Del Vecchio, R. A., Guthrie, D. H., Pond, A. J., Grzelak, M. E., *et al.* (2005). Characterization of the nociceptin receptor (ORL-1) agonist, Ro64-6198, in tests of anxiety across multiple species. *Psychopharmacology (Berl)* 182, 132-143.
- Varty, G. B., Lu, S. X., Morgan, C. A., Cohen-Williams, M. E., Hodgson, R. A., Smith-Torhan, A., Zhang, H., Fawzi, A. B., Graziano, M. P., Ho, G. D., *et al.* (2008). The anxiolytic-like effects of the novel, orally active nociceptin opioid receptor agonist 8-[bis(2-methylphenyl)methyl]-3-phenyl-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ol (SCH 221510). *J Pharmacol Exp Ther* 326, 672-682.
- Verwer, R. W., Meijer, R. J., Van Uum, H. F., and Witter, M. P. (1997). Collateral projections from the rat hippocampal formation to the lateral and medial prefrontal cortex. *Hippocampus* 7, 397-402.
- Viaro, R., Sanchez-Pernaute, R., Marti, M., Trapella, C., Isacson, O., and Morari, M. (2008). Nociceptin/orphanin FQ receptor blockade attenuates MPTP-induced parkinsonism. *Neurobiol Dis* 30, 430-438.
- Vitale, G., Arletti, R., Ruggieri, V., Cifani, C., and Massi, M. (2006). Anxiolytic-like effects of nociceptin/orphanin FQ in the elevated plus maze and in the conditioned defensive burying test in rats. *Peptides* 27, 2193-2200.
- Vocci, F. J., Acri, J., and Elkashef, A. (2005). Medication development for addictive disorders: the state of the science. *Am J Psychiatry* 162, 1432-1440.
- Voss, J. L., and Paller, K. A. (2008). Brain substrates of implicit and explicit memory: The importance of concurrently acquired neural signals of both memory types. *Neuropsychologia* 46, 3021-3029.
- Walker, D. L., and Davis, M. (1997). Double dissociation between the involvement of the bed nucleus of the stria terminalis and the central nucleus of the amygdala in startle increases produced by conditioned versus unconditioned fear. *J Neurosci* 17, 9375-9383.
- Walker, D. L., Ressler, K. J., Lu, K. T., and Davis, M. (2002). Facilitation of conditioned fear extinction by systemic administration or intra-amygdala infusions of D-cycloserine as assessed with fear-potentiated startle in rats. *J Neurosci* 22, 2343-2351.
- Walker, E. A., and Sterious, S. N. (2005). Opioid antagonists differ according to negative intrinsic efficacy in a mouse model of acute dependence. *Br J Pharmacol* 145, 975-983.
- Wang, H., Ferguson, G. D., Pineda, V. V., Cundiff, P. E., and Storm, D. R. (2004). Overexpression of type-1 adenylyl cyclase in mouse forebrain enhances recognition memory and LTP. *Nat Neurosci* 7, 635-642.

- Wang, H., Hu, Y., and Tsien, J. Z. (2006). Molecular and systems mechanisms of memory consolidation and storage. *Prog Neurobiol* 79, 123-135.
- Wang, J. B., Johnson, P. S., Imai, Y., Persico, A. M., Ozenberger, B. A., Eppler, C. M., and Uhl, G. R. (1994). cDNA cloning of an orphan opiate receptor gene family member and its splice variant. *FEBS Lett* 348, 75-79.
- Wang, J. Q., Fibuch, E. E., and Mao, L. (2007). Regulation of mitogen-activated protein kinases by glutamate receptors. *J Neurochem* 100, 1-11.
- Wang, Y., Wang, J., Zhu, C., Cao, X., and Wu, G. (2000). Evidence of the synthesis of opioid receptor like 1 receptor in nociceptinergic neurons in rat brain suggests the existence of autoreceptor: a confocal double staining study. *Neurosci Lett* 290, 193-196.
- Watanabe, H., Mizoguchi, H., Orito, T., Katsuyama, S., Yonezawa, A., Watanabe, C., Sakurada, T., and Sakurada, S. (2007). Possible involvement of endogenous nociceptin/orphanin FQ in the pain-related behavioral responses induced by its own metabolite, nociceptin/orphanin FQ(14-17). *Peptides* 28, 670-677.
- Wayman, G. A., Lee, Y. S., Tokumitsu, H., Silva, A., and Soderling, T. R. (2008). Calmodulin-kinases: modulators of neuronal development and plasticity. *Neuron* 59, 914-931.
- Wei, W. Z., and Xie, C. W. (1999). Orphanin FQ suppresses NMDA receptor-dependent long-term depression and depotentiation in hippocampal dentate gyrus. *Learn Mem* 6, 467-477.
- White, D. A., Hwang, M. L., and Holtzman, S. G. (2005). Naltrexone-induced conditioned place aversion following a single dose of morphine in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 81, 451-458.
- White, N. M., and McDonald, R. J. (2002). Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. *Neurobiol Learn Mem* 77, 125-184.
- Wichmann, J., Adam, G., Rover, S., Hennig, M., Scalone, M., Cesura, A. M., Dautzenberg, F. M., and Jenck, F. (2000). Synthesis of (1S,3aS)-8-(2,3,3a,4,5, 6-hexahydro-1H-phenalen-1-yl)-1-phenyl-1,3,8-triaza-spiro[4.5]decan-4-one, a potent and selective orphanin FQ (OFQ) receptor agonist with anxiolytic-like properties. *Eur J Med Chem* 35, 839-851.
- Wick, M. J., Minnerath, S. R., Lin, X., Elde, R., Law, P. Y., and Loh, H. H. (1994). Isolation of a novel cDNA encoding a putative membrane receptor with high homology to the cloned mu, delta, and kappa opioid receptors. *Brain Res Mol Brain Res* 27, 37-44.
- Williams, S. H. (2005). Medications for treating alcohol dependence. *Am Fam Physician* 72, 1775-1780.
- Willner, P. (2005). Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology* 52, 90-110.
- Wiltgen, B. J., Brown, R. A., Talton, L. E., and Silva, A. J. (2004). New circuits for old memories: the role of the neocortex in consolidation. *Neuron* 44, 101-108.
- Wiltgen, B. J., Sanders, M. J., Anagnostaras, S. G., Sage, J. R., and Fanselow, M. S. (2006). Context fear learning in the absence of the hippocampus. *J Neurosci* 26, 5484-5491.
- Wiltgen, B. J., and Silva, A. J. (2007). Memory for context becomes less specific with time. *Learn Mem* 14, 313-317.

- Winters, B. D., Forwood, S. E., Cowell, R. A., Saksida, L. M., and Bussey, T. J. (2004). Double dissociation between the effects of peri-postrhinal cortex and hippocampal lesions on tests of object recognition and spatial memory: heterogeneity of function within the temporal lobe. *J Neurosci* 24, 5901-5908.
- Winters, B. D., Saksida, L. M., and Bussey, T. J. (2008). Object recognition memory: neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. *Neurosci Biobehav Rev* 32, 1055-1070.
- Wise, R. A., Leone, P., Rivest, R., and Leeb, K. (1995). Elevations of nucleus accumbens dopamine and DOPAC levels during intravenous heroin self-administration. *Synapse* 21, 140-148.
- Witta, J., Palkovits, M., Rosenberger, J., and Cox, B. M. (2004). Distribution of nociceptin/orphanin FQ in adult human brain. *Brain Res* 997, 24-29.
- Wu, C. C., Chen, J. Y., Tao, P. L., Chen, Y. A., and Yeh, G. C. (2005). Serotonin reuptake inhibitors attenuate morphine withdrawal syndrome in neonatal rats passively exposed to morphine. *Eur J Pharmacol* 512, 37-42.
- Yamaguchi, S., Hale, L. A., D'Esposito, M., and Knight, R. T. (2004). Rapid prefrontal-hippocampal habituation to novel events. *J Neurosci* 24, 5356-5363.
- Yu, T. P., and Xie, C. W. (1998). Orphanin FQ/nociceptin inhibits synaptic transmission and long-term potentiation in rat dentate gyrus through postsynaptic mechanisms. *J Neurophysiol* 80, 1277-1284.
- Yuan, L. L., Adams, J. P., Swank, M., Sweatt, J. D., and Johnston, D. (2002). Protein kinase modulation of dendritic K⁺ channels in hippocampus involves a mitogen-activated protein kinase pathway. *J Neurosci* 22, 4860-4868.
- Yung, L. Y., Joshi, S. A., Chan, R. Y., Chan, J. S., Pei, G., and Wong, Y. H. (1999). Galphal1 (Galphal4) couples the opioid receptor-like1 receptor to stimulation of phospholipase C. *J Pharmacol Exp Ther* 288, 232-238.
- Zarrindast, M. R., Bananej, M., Khalilzadeh, A., Fazli-Tabaei, S., Haeri-Rohani, A., and Rezaeifard, A. (2006). Influence of intracerebroventricular administration of dopaminergic drugs on morphine state-dependent memory in the step-down passive avoidance test. *Neurobiol Learn Mem* 86, 286-292.
- Zaveri, N. (2003). Peptide and nonpeptide ligands for the nociceptin/orphanin FQ receptor ORL1: research tools and potential therapeutic agents. *Life Sci* 73, 663-678.
- Zeilhofer, H. U., and Calo, G. (2003). Nociceptin/orphanin FQ and its receptor--potential targets for pain therapy? *J Pharmacol Exp Ther* 306, 423-429.
- Zentall, T. R. (2006). Mental time travel in animals: a challenging question. *Behav Processes* 72, 173-183.
- Zhang, D., Zhou, X., Wang, X., Xiang, X., Chen, H., and Hao, W. (2007). Morphine withdrawal decreases responding reinforced by sucrose self-administration in progressive ratio. *Addict Biol* 12, 152-157.
- Zhang, X., Beaulieu, J. M., Sotnikova, T. D., Gainetdinov, R. R., and Caron, M. G. (2004). Tryptophan hydroxylase-2 controls brain serotonin synthesis. *Science* 305, 217.
- Zhang, Z., Xin, S. M., Wu, G. X., Zhang, W. B., Ma, L., and Pei, G. (1999). Endogenous delta-opioid and ORL1 receptors couple to phosphorylation and activation of p38 MAPK in NG108-15 cells and this is regulated by protein kinase A and protein kinase C. *J Neurochem* 73, 1502-1509.

Zhao, Z. Q., Gao, Y. J., Sun, Y. G., Zhao, C. S., Gereau, R. W. t., and 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*, 14519-14524.

Zhu, J. J., Qin, Y., Zhao, M., Van Aelst, L., and Malinow, R. (2002). Ras and Rap control AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity. *Cell* *110*, 443-455.

Zlomuzica, A., De Souza Silva, M. A., Huston, J. P., and Dere, E. (2007). NMDA receptor modulation by D-cycloserine promotes episodic-like memory in mice. *Psychopharmacology (Berl)* *193*, 503-509.

Zola-Morgan, S., Squire, L. R., and Amaral, D. G. (1989). Lesions of the hippocampal formation but not lesions of the fornix or the mammillary nuclei produce long-lasting memory impairment in monkeys. *J Neurosci* *9*, 898-913.