

2009

N°

THESE

pour l'obtention du Diplôme d'État de

DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement

par

Antoine LODIOT  
le 10 juillet 2009

**Les tests d'évaluation  
de l'addiction et de la mémoire  
chez le rongeur  
Revue bibliographique**

JURY

M. Jean-Michel Warnet, Président  
M. Patrice Rat  
M. Pierre Lainée



*Je tiens à remercier :*

*Monsieur Pierre Lainée, Directeur de la Pharmacologie au CIT pendant mes travaux, qui a accepté d'être mon directeur de thèse et m'a offert son aide précieuse et ses conseils avisés pendant la rédaction de cet ouvrage,*

*Monsieur Guillaume Forget, Directeur d'études senior en Pharmacologie au CIT pendant mes travaux, qui m'a aidé et supporté pendant les six mois de mon stage,  
Ainsi que Anne Marie Bétat, Virginie Struxiano, Estelle Houivet, Sidonie Gervais, Christelle Breuillard, Vincent Gouysse et Laurent Camus, qui par leur accueil et leur aide ont tous contribué au bon déroulement de mon stage,*

*Monsieur Jean-Michel Warnet, Professeur émérite au laboratoire de Toxicologie de l'Université de Paris V René Descartes, et  
Monsieur Patrice Rat, Maître de Conférence au laboratoire de Toxicologie de l'Université de Paris V René Descartes, qui me font l'honneur de juger ce travail.*

*Merci à tous mes proches et amis, qui m'ont toujours soutenu et encouragé.*

## Lexique

|                                     |                                                                                                       |
|-------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CHMP .....                          | Committee for Medicinal Products for Human Use                                                        |
| WHO (OMS).....                      | Organisation Mondiale de la Santé (World Health Organisation)                                         |
| Renforcement .....                  | Forme d'apprentissage pas association                                                                 |
| PPC (CPP).....                      | Place de Préférence Conditionnée (Conditioned Place Preference)                                       |
| AA (SA).....                        | Autoadministration (self-administration)                                                              |
| DD.....                             | Drug Discrimination                                                                                   |
| Rapport fixe (Fixed ratio).....     | Nombre de réponses nécessaires à la dispense du renforcement                                          |
| Temps de réfraction (Time out)..... | Temps pendant lequel les réponses sur le levier actif n'auront plus de conséquences                   |
| Généralisation.....                 | Test de discrimination permettant la détection d'effets similaires à ceux d'une drogue d'entraînement |
| Blocage .....                       | Test de discrimination permettant la détection d'effets opposés à ceux d'une drogue d'entraînement    |
| PLT (LTP) .....                     | Potentialisation long-terme (long-term potentialisation)                                              |
| TRO (ORT) .....                     | Test de reconnaissance d'objet (object recognition task)                                              |
| DI .....                            | Discrimination index (indice de discrimination)                                                       |
| RI .....                            | Recognition index (indice de reconnaissance)                                                          |
| HI .....                            | Habituation index (indice d'habituation)                                                              |
| EI .....                            | Exploration index (indice d'exploration)                                                              |
| ESM (SEM).....                      | Écart standard à la moyenne (standard error of mean)                                                  |



# SOMMAIRE

|         |                                                               |    |
|---------|---------------------------------------------------------------|----|
| I       | INTRODUCTION .....                                            | 1  |
| II      | LA DEPENDANCE .....                                           | 5  |
| II.1    | Le renforcement .....                                         | 6  |
| II.1.1  | Les deux types de conditionnement et les tests associés ..... | 6  |
| II.1.2  | Préférence de place conditionnée .....                        | 12 |
| II.1.3  | Auto-administration .....                                     | 17 |
| II.1.4  | Discrimination .....                                          | 23 |
| II.2    | Le syndrome de sevrage .....                                  | 31 |
| II.2.1  | Physiologie .....                                             | 31 |
| II.2.2  | Test de sevrage .....                                         | 32 |
| II.3    | Discussion .....                                              | 40 |
| III     | LA MEMOIRE .....                                              | 45 |
| III.1   | Mécanismes de la mémoire .....                                | 46 |
| III.1.1 | Définition .....                                              | 46 |
| III.1.2 | Mécanismes cérébraux .....                                    | 47 |
| III.1.3 | Mécanismes moléculaires .....                                 | 48 |
| III.1.4 | Les tests d'évaluation des fonctions cognitives .....         | 49 |
| III.2   | Labyrinthes .....                                             | 50 |
| III.2.1 | Généralités .....                                             | 50 |
| III.2.2 | Labyrinthe aquatique de Morris .....                          | 50 |
| III.3   | Les techniques de conditionnement .....                       | 53 |
| III.3.1 | Généralités .....                                             | 53 |
| III.3.2 | Exemple du test d'alternance acquise en labyrinthe en T ..... | 55 |
| III.4   | Tâche d'appariement à un modèle .....                         | 58 |
| III.4.1 | Généralités .....                                             | 58 |
| III.4.2 | Reconnaissance d'objet .....                                  | 58 |
| III.5   | Discussion .....                                              | 63 |
| IV      | CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....                              | 67 |
| V       | BIBLIOGRAPHIE - SITOGRAPHIE .....                             | 71 |
| VI      | ANNEXE .....                                                  | 84 |

# **I INTRODUCTION**

**A**u cours du développement des médicaments, les nouvelles molécules sont soumises à de nombreux tests précliniques, définis dans des lignes directrices. Ainsi, l'évaluation standard de la sécurité d'un nouveau médicament comprend des études de génotoxicité, de toxicité aiguë et de tolérance locale, suivies de celles de pharmacologie de sécurité et de pharmacotoxicocinétique, et enfin des études de toxicité subchronique et chronique, de reprotoxicité et de cancérogenèse.

Ces lignes directrices sont en évolution constante, afin de prendre en compte les nouvelles découvertes de pharmacovigilance ou les tendances sociétales. Ainsi, l'un des derniers textes entrés en vigueur en mars 2006 est la ligne directrice du CHMP (Committee For Human Medicinal Products) : « Guideline on the non-clinical investigation of the dependence potential of medicinal product » <sup>(49)</sup>. Elle définit les études de recherche d'un potentiel addictif qui doivent être réalisées pour toute nouvelle molécule active sur le système nerveux central ou pour toute molécule dont les métabolites sont susceptibles d'avoir une action sur le système nerveux central.

Une substance active possédant un potentiel de dépendance peut entraîner un syndrome de dépendance, qui a été défini par l'OMS dans l'ICD-10 (International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, Tenth Revision, 2<sup>nd</sup> edition) comme un ensemble de phénomènes comportementaux, cognitifs, et physiologiques qui se développent après usage répété d'une substance <sup>(94)</sup>, tels :

- La perte de contrôle sur la consommation (fort désir de reprendre la drogue, difficultés à contrôler son usage, persistance malgré des conséquences graves pour la santé, grande priorité pour l'usage de la drogue plutôt que pour les autres activités et obligations),
- L'adaptation de l'organisme (augmentation de la tolérance, état de sevrage physique).

Le potentiel addictif d'un médicament peut être évalué en plusieurs étapes, avec tout d'abord la pharmacologie *in vitro* (études des liaisons aux récepteurs, effet agoniste antagoniste) puis la pharmacologie *in vivo* (microdialyse, activité locomotrice, antinociception).

Le choix ou l'obligation de pratiquer des études spécifiques sera décidé en fonction des résultats obtenus au cours du développement. Notamment, il ne sera pas nécessaire d'effectuer des études d'évaluation du potentiel de dépendance si celui-ci apparaît évident d'après les études pharmacologiques (agoniste  $\mu$  complet par exemple) ou si les trois conditions suivantes sont réunies:

- Aucune interaction avec les cibles moléculaires considérées comme responsables de l'activité de dépendance n'est observée aux concentrations significatives ou quand cette interaction est observée, elle n'implique pas d'effets fonctionnels,
- Les investigations *in vivo* ne mettent pas en évidence de potentiel addictif,
- La substance active n'a pas un mécanisme d'action « nouveau ».

Si par contre, le potentiel de dépendance ne peut pas être formellement écarté, il faudra l'évaluer dans des études comportementales spécifiques. Plusieurs aspects de la dépendance sont alors évalués et plusieurs types d'études sont réalisées.

- L'évaluation du syndrome de sevrage et utilisation des données de tolérance,
- L'évaluation des effets de renforcement de la substance active,
- Les études de discrimination.



La ligne directrice mentionne pour ces études quelques spécificités à prendre en compte. L'accent est mis sur le choix des doses à évaluer, qui diffère des habitudes des autres études précliniques, puisque deux doses peuvent s'avérer suffisantes:

- Une très faible dose à laquelle aucun effet comportemental n'est observé,
- Une dose très élevée (plusieurs fois la dose thérapeutique attendue chez l'homme), qui doit également être supérieure à la dose maximale tolérée dans l'espèce animale choisie (en tenant compte du bien-être de l'animal et des interférences possibles avec l'interprétation des résultats).

Dans ces études, il est clairement fait mention de l'utilisation de témoins positifs et négatifs.

Ces études d'évaluation du potentiel de dépendance sont généralement effectuées en parallèle d'autres études comportementales, telles que l'évaluation de la mémoire, de l'activité locomotrice, de la motivation, de façon à potentialiser les résultats observés. Lors du développement du médicament, ces tests sont réalisés pendant les études de Pharmacologie de Sécurité <sup>(114)</sup>.

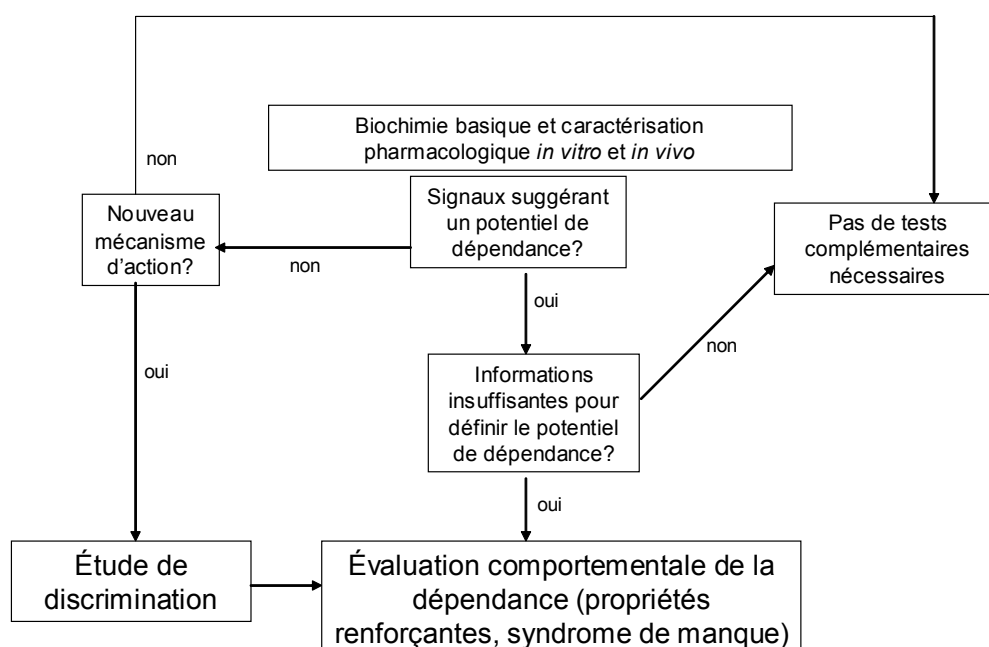


Figure 1 : Arbre décisionnel de l'évaluation préclinique du potentiel de dépendance d'une substance active sur le SNC.

L'objectif de cette thèse est de considérer d'un point de vue bibliographique différents tests comportementaux destinés à évaluer la dépendance et la mémoire chez l'animal, tel que le recommande la ligne directrice du CHMP <sup>(49)</sup>. Nous détaillerons successivement le principe, le déroulement et les paramètres fondamentaux de différents tests, puis leurs avantages et inconvénients respectifs.



## **II LA DEPENDANCE**

La toxicomanie regroupe les notions de dépendance psychologique, de dépendance physique et de tolérance. Les deux phénomènes de la tolérance et de la dépendance physique se développent très souvent en parallèle ; en revanche, ils sont relativement disjoints de la dépendance psychologique.

Les animaux sont sujets aux mêmes phénomènes de dépendance que l'humain. La dépendance chez l'animal peut être modélisée et évaluée et le modèle animal s'avère très utile pour prévoir le potentiel de dépendance de substances.

Certaines composantes de la dépendance psychologique sont approchées par les tests dérivant des techniques de conditionnement, alors que la dépendance physique peut être approchée par l'évaluation du syndrome de sevrage.

Les différents modèles expérimentaux permettent ainsi de cerner le profil de dépendance des substances testées. Par contre, ces études ne sauraient être raisonnablement séparées de l'analyse des facteurs environnementaux, affectifs et psychologiques qui poussent l'individu à consommer des drogues <sup>(S18)</sup>.

## II.1 Le renforcement

### II.1.1 Les deux types de conditionnement et les tests associés

Le conditionnement est une forme d'apprentissage par association. Deux principaux types de conditionnement peuvent être définis : le conditionnement de Pavlov (type I) et le conditionnement de Skinner (type II). Dans le premier cas le stimulus conditionnant est un événement extérieur; dans le second il s'agit d'une action de l'animal lui-même. Ces deux conditionnements présentent les mêmes caractéristiques <sup>(S1)</sup>.

- Les effets du conditionnement sont acquis, individuels et temporaires.
- Ils s'atténuent et disparaissent s'ils ne sont pas entretenus (extinction).
- La réponse attendue est stéréotypée (involontaire, prévisible, reproductible).
- Ils nécessitent la création d'une nouvelle liaison nerveuse fonctionnelle entre organes récepteurs et effecteurs intervenant dans la réponse conditionnée.

Toute réaction conditionnée installée chez un sujet peut disparaître (phénomène d'extinction) et réapparaître (phénomène de réinstallation) (figure 2).

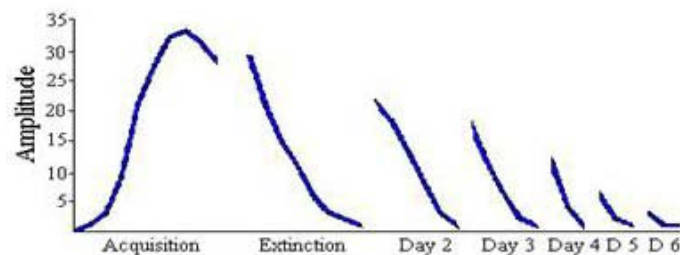


Figure 2 : Conditionnement et extinction <sup>(S6)</sup>.

Pour rendre compte de la force d'une réaction conditionnelle, trois paramètres sont à considérer :

- La fréquence : Après un certain nombre de présentations du stimulus neutre et du stimulus inconditionnel apparaît le stimulus conditionnel,
- L'amplitude : Paramètre qui rend compte de la quantité de réponses. L'amplitude s'accroît en fonction du nombre de renforcements jusqu'à devenir stable,
- La latence : Délai entre la présentation du stimulus conditionnel et la réaction conditionnelle. La latence diminue en fonction du nombre de renforcements.

Il est alors possible d'utiliser cette réaction conditionnée pour l'évaluation des fonctions cognitives par exemple l'apprentissage ou la mémoire court terme.

### a. Conditionnement de type I

Le conditionnement de type I, appelé aussi classique, physiologique, répondant ou de Pavlov, a été rendu célèbre par les expériences sur des chiens d'un physiologiste russe, Yvan Pavlov (1849-1936).

Il consiste en l'association en contingence de deux stimuli. Par le couplage d'un stimulus neutre (SN) n'ayant au départ aucune propriété particulière de conditionnement et d'un stimulus inconditionnel (SI) qui déclenche de façon physiologique une réponse inconditionnelle (RI), le stimulus neutre arrivera à provoquer, par sa présence seule, la réponse de départ (alors nommée réponse conditionnelle RC). A cette étape, le stimulus neutre se nommera stimulus conditionnel (SC).

Le conditionnement de type I peut donc se décomposer en trois phases (figure 3): les exemples utilisés correspondent à ceux de l'expérience de Pavlov (137, 138, S11) :

- Avant conditionnement : le stimulus inconditionnel (apport de nourriture) entraîne une réponse inconditionnelle (augmentation de la salivation) alors qu'un stimulus neutre (son d'une clochette) n'entraîne aucune réaction.
- Conditionnement : le stimulus inconditionnel est associé au stimulus neutre (son de la clochette) qui devient alors stimulus conditionnel.
- Après conditionnement : Le stimulus conditionnel seul (son de la clochette) entraîne la réponse conditionnée (salivation).

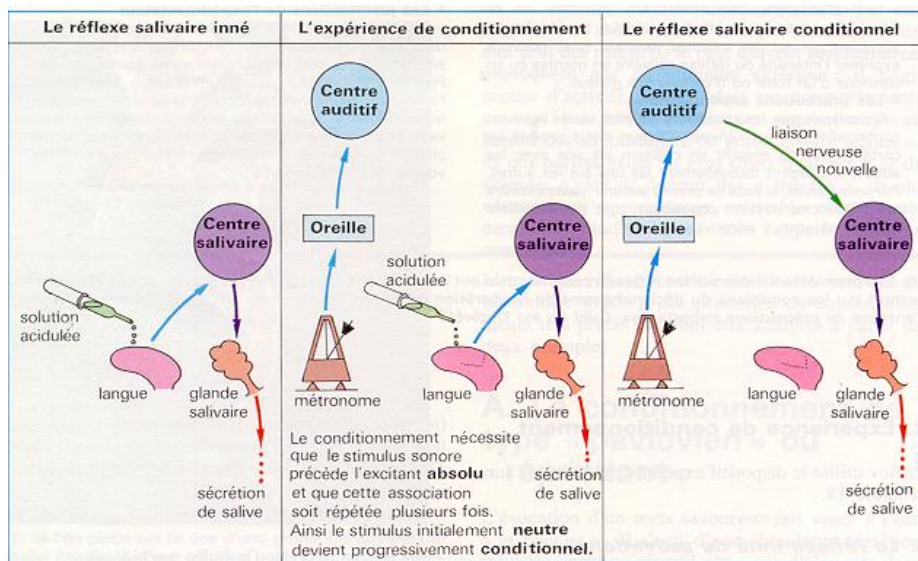


Figure 3 : Principe du conditionnement pavlovien, exemple de l'expérience de Pavlov. Avant conditionnement, le son de la clochette n'entraîne aucune salivation. Après conditionnement, le chien salive au seul son de la clochette (S11).

Plusieurs conditions doivent être réunies pour permettre l'établissement d'un conditionnement pavlovien :

- le stimulus conditionnel (le son) doit être neutre et nouveau (pour ne pas déjà être associé à un autre stimulus).
- le stimulus conditionnel doit servir de signal et doit créer une réaction d'alerte.
- le stimulus conditionnel doit précéder ou accompagner (mais en aucun cas suivre) le stimulus inconditionné (nourriture).
- Il faut faire également attention à ce que d'autres stimuli (ex : inhérents au manipulateur lui-même) ne servent pas involontairement de stimulus conditionné.

Sur la base de ce type de conditionnement, plusieurs tests ont été développés et sont maintenant utilisés dans l'évaluation du potentiel de conditionnement :

- Test de préférence de place : L'animal est conditionné à associer l'administration de la substance (SI) à un premier environnement (neutre) et l'administration du véhicule (SI) à un second environnement (neutre). Chaque compartiment diffère par les couleurs et motifs des parois, la texture des sols, les odeurs... L'animal est ensuite testé pour déterminer sa préférence de place (RC). Il choisira l'environnement selon l'effet appétitif ou aversif de la substance testée.
- Test d'aversion gustative/olfactive conditionnée : Dans ce test d'évaluation de la mémoire, l'animal associe une sensation désagréable (SI) (malaise digestif dû à du LiCl ou léger choc électrique) à un comportement (SC) (consommation d'eau sucrée par exemple). Dans ce test d'évaluation des fonctions mnésiques, l'animal va spontanément diminuer sa consommation d'eau sucrée. L'administration d'une substance amnésiante va abolir cette diminution.
- Test de tolérance conditionnée : Il s'agit de la diminution de l'effet d'un produit après administration répétée en présence d'un stimulus. Par exemple, l'installation d'une tolérance de la morphine chez le rat est plus rapide si les injections de morphine et les tests d'analgésie sont réalisés dans un seul et unique environnement <sup>(S16)</sup>.
- D'autres méthodes dérivant du conditionnement de Pavlov sont utilisées, telles que le syndrome de sevrage conditionné, la sensibilisation conditionnée, la réponse émotionnelle conditionnée...

### b. Conditionnement de type II

Le conditionnement de type II, appelé aussi opérant, instrumental ou de Skinner est un concept élaboré par l'américain B.F. Skinner (1904-1990) en 1938 <sup>(168)</sup> et est issu de l'apprentissage par essais et erreurs de Thorndike (1874-1949).

Thorndike a réalisé ses expériences sur "des boîtes à problèmes", dans lesquelles un chat mis à jeun est placé dans une cage avec de la nourriture disposée à l'extérieur <sup>(S7, S18)</sup>. Le chat a accès à la nourriture s'il manœuvre correctement le loquet de la porte. Placé dans cette situation l'animal manifeste des comportements divers dits exploratoires puis, par hasard, il manœuvre le loquet ce qui lui donne accès à la nourriture (figure 4).

Au cours d'essais successifs, on constate que le temps mis par l'animal pour sortir diminue régulièrement. La courbe d'acquisition ainsi obtenue démontre qu'un comportement efficace s'acquiert progressivement, par essais et erreurs, lorsqu'il est récompensé par ses conséquences.

Thorndike en tire notamment la loi de l'effet et la loi de l'exercice :

« les réponses à une situation qui sont suivies par une récompense seront conservées »

« Le renforcement des connexions entre une situation (la cage dans laquelle se trouve l'animal) et la réponse (la manipulation adéquate du loquet) conduit à une augmentation de la fréquence d'apparition de la réponse correcte ».

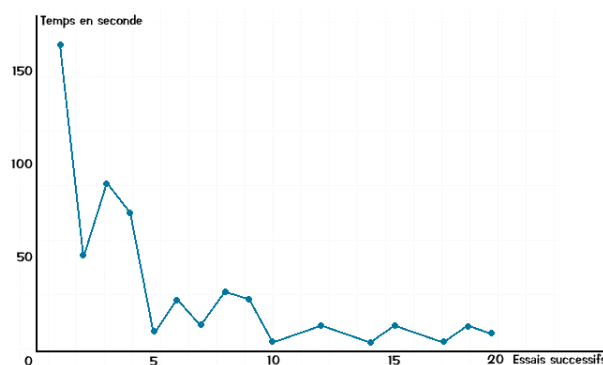


Figure 4 : Temps pour sortir de la boîte de Thorndike. Le temps mis par l'animal diminue au fur et à mesure des essais successifs <sup>(S7)</sup>.

Skinner se repose sur les travaux de Thorndike pour développer le conditionnement opérant. Le conditionnement de type II est un processus de modification du comportement résultant de l'association d'un *comportement* et d'un *stimulus*.

Dans le conditionnement de type II, l'animal se conditionne lui-même par association entre stimuli et réponses. Les stimuli peuvent correspondre à des renforcements positifs, des renforcements négatifs, des punitions positives ou des punitions négatives.

Les conséquences du comportement de l'animal auront un effet sur la probabilité que ce comportement se reproduise ou non. Ce conditionnement vise donc à contrôler un comportement (réponse) en le faisant suivre de façon systématique par un renforcement.



Ici également, les principes exposés ont conduit à la mise en place de tests dérivant du conditionnement de type II :

- Auto-administration : Skinner, en 1968 <sup>(169)</sup>, a développé une méthode d'évaluation de l'apprentissage qui consistait en une cage comportant un levier susceptible de délivrer lors d'une pression, de la nourriture à l'animal. Celui-ci appuie d'abord de façon fortuite sur le levier, mais très vite il découvre que des pressions répétées entraînent systématiquement la délivrance de nourriture, qui constitue une récompense, un renforcement positif. Aujourd'hui, l'auto-administration parentérale est une méthode de référence pour l'évaluation du potentiel de dépendance des substances actives. Elle consiste en l'implantation chez l'animal d'un cathéter intracardiaque ou intraveineux qui lui permet lors de pressions sur un levier de s'injecter des doses de la substance à tester <sup>(191)</sup>.
- Discrimination de substances : La méthode de discrimination implique un entraînement de l'animal à effectuer une réponse différente lors de l'administration de différentes substances. L'animal est par exemple conditionné à associer la pression du levier gauche avec l'administration d'une substance présentant des propriétés de renforcement et le levier droit avec l'administration du véhicule. Le test d'une nouvelle substance entraînera une réponse différente selon la nature du pré-traitement. Elle permet de différencier et/ou de quantifier les effets des substances.

### *c. Différences entre ces types de conditionnement*

Les auteurs ont des avis très partagés sur ce sujet. Certains, comme Richelle, écrivent que « la distinction entre les deux types [de conditionnement] n'existe pas au niveau des mécanismes, elle ne se justifie qu'au niveau des procédures. Elle n'existe pas dans le comportement du sujet, elle n'existe que dans celui de l'expérimentateur » <sup>(150)</sup>.

D'autres sont plus mitigés et mettent en évidence une distinction entre conditionnement de type I et conditionnement de type II.

Dans le conditionnement de type I, la présentation du stimulus inconditionnel, qui permet de renforcer la réponse, dépend de l'expérimentateur, alors qu'elle dépend de la réponse du sujet dans le conditionnement de type II.

La plupart des substances inductrices de dépendance (excepté le LSD et le delta-9-tetrahydrocannabinol) sont des renforçateurs de comportement. L'effet induit par la drogue peut donc être conditionné (stimulus inconditionnel) selon le modèle de Pavlov ou de Skinner <sup>(137, 138, 168)</sup>.

## II.1.2 Préférence de place conditionnée

La technique de préférence de place conditionnée évalue l'apprentissage associatif engendré par la prise d'une substance.

### a. Principe du test

La technique peut se décomposer en trois phases :

- Le préconditionnement, qui a pour but l'évaluation de la préférence de base des animaux pour les deux environnements.
- Le conditionnement, pendant lequel l'animal est traité et est placé dans le compartiment associé au traitement.
- La phase de test, qui détermine la préférence de place de l'animal après conditionnement. Dans le cas d'une substance à effet renforçant, le temps passé dans le compartiment associé à la drogue est significativement augmenté par rapport au temps passé dans le compartiment associé au véhicule (figures 5 et 6).

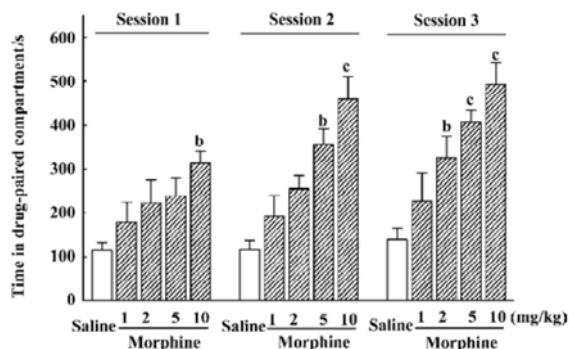


Figure 5: Effet de la morphine sur le développement de la préférence de place conditionnée chez le rat. Après administration de la morphine par voie intrapéritonéale aux doses de 1, 2, 4, 10 mg/kg 5 min avant conditionnement (n=14-16), le temps passé dans le compartiment associé à la morphine augmente significativement en fonction de la dose. (\*P<0,05 ; \*\*P<0,01) (81).

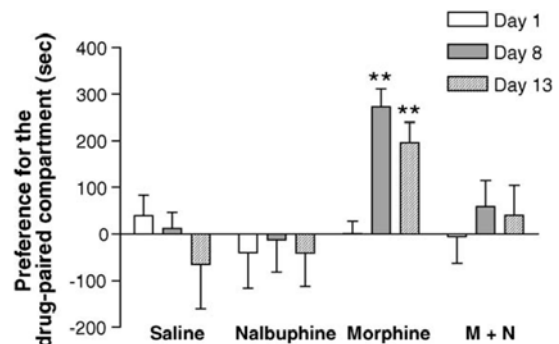


Figure 6: Effet de la nalbuphine sur le développement de la préférence de place induite par la morphine. La préférence de place des animaux a été évaluée aux jours 1, 8 et 13 après traitement au véhicule, à la nalbuphine, à la morphine ou à une combinaison de morphine et de nalbuphine. La combinaison morphine/nalbuphine inhibe la préférence de place induite par le traitement à la morphine seule. (\*\*P<0,01 ; n>8) (176).

Lors d'un test de préférence de place conditionnée sont mesurés:

- les temps passés dans chacun des compartiments, paramètre indiquant la préférence de place des animaux,
- le nombre d'entrées et sorties dans les compartiments,
- et l'activité locomotrice (dont les modifications peuvent biaiser l'interprétation).

### b. Réalisation du test

Il existe deux types de préférence de place selon la préférence de base de l'animal <sup>(28, 36, 129)</sup> (figure 7).

Si les deux compartiments sont de même « attractivité », la méthode est dite « balancée » et les animaux peuvent être « contre-balancés » dans l'un ou l'autre des compartiments (c'est-à-dire la première moitié des animaux associera l'administration de la substance au compartiment A et l'autre moitié des animaux associera l'administration de la substance au compartiment B).

Si les deux compartiments n'ont pas la même « attractivité intrinsèque » et que les animaux ont une préférence de base marquée pour l'un des deux compartiments, il s'agit d'associer le compartiment le moins appétant à la substance active et d'analyser enfin la différence de temps passés dans ce compartiment avant et après conditionnement. La méthode est alors dite « non-balancée ». Il faut dans ce cas prouver que l'augmentation du temps passé dans le compartiment associé à l'administration de substance active (c'est-à-dire le moins appétant) est significative par rapport à l'augmentation de temps passé dans ce même compartiment chez les animaux contrôle.

La sensibilité des deux méthodes n'est pas identique selon les molécules testées; par exemple, les aversions conditionnées dues à l'administration de la naloxone ne sont généralement pas mises en évidence par la méthode non-balancée <sup>(28)</sup>.

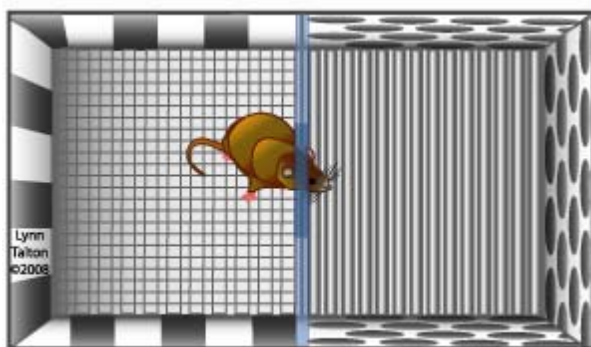


Figure 7 : Cage de préférence de place avec motifs muraux et sols texturés.

### c. Paramètres

De nombreuses publications ou méta-analyses ont été réalisées. Ici est présentée une synthèse de ces articles <sup>(13, 28, 35, 58, 179, 180)</sup>.

Plusieurs souches de rats peuvent être utilisées mais aucune différence n'est significative n'est notée dans les réponses à ce test. Les deux sexes peuvent être utilisés invariablement <sup>(28)</sup>.

La morphine est la molécule la plus citée dans ce type de test, car son pouvoir addictif est reconnu et qu'une large gamme de doses peut être utilisée <sup>(56, 124, 139, 149)</sup>. D'autres molécules induisent des réponses positives en préférence de place : héroïne <sup>(28)</sup>, nicotine <sup>(19, 23, 67, 76, 111)</sup>, cocaïne <sup>(23, 37)</sup>, amphétamine <sup>(33, 78)</sup>, clonidine <sup>(162)</sup>, diazépam <sup>(173)</sup>.

De nombreux paramètres doivent être pris en compte lors de la mise au point du test. Chacun de ces paramètres peut faire varier la réponse issue du conditionnement <sup>(28, 36, 129, 179)</sup>.

- Le nombre de préconditionnements : Le stimulus neutre (présentation de l'environnement visuel et tactile) doit répondre à différents impératifs pour permettre l'établissement du conditionnement, notamment être nouveau. Le nombre de phases de préconditionnement doit donc être limité pour éviter d'en faire un stimulus conditionnel déjà associé pour l'animal à une période de tests. La plupart des auteurs considèrent qu'une seule session de préconditionnement est nécessaire à l'animal. Celle-ci a pour but de déterminer la préférence de base que l'animal a pour les compartiments, ainsi que son activité locomotrice.
- La durée de préconditionnement : Elle doit être aussi importante que la durée de test, ainsi les résultats peuvent-ils être comparés temps à temps. Elle n'excède pas la durée de conditionnement.
- Le nombre de conditionnements : La force du conditionnement dépend du nombre d'associations entre la substance à tester (morphine) et l'environnement visuel et tactile. Il est le plus souvent fait mention de trois ou quatre sessions de conditionnement à la substance. Selon M.A. Bozarth <sup>(28)</sup>, qui a réalisé une étude paramétrique de la préférence de place, « les sujets conditionnés pendant trois essais semblent montrer une préférence de place supérieure à ceux conditionnés une seule fois ». De la même façon, « une augmentation du nombre de conditionnements - supérieur à trois - n'a que peu d'effets sur la préférence de place » (figure 8).

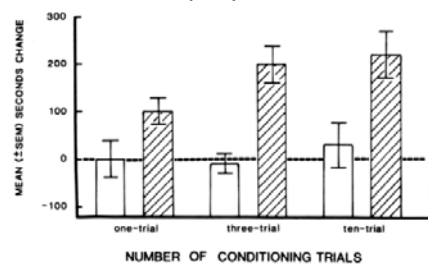


Figure 8 : Effet du nombre d'essais de conditionnement sur la force de la préférence de place conditionnée. La figure présente les moyennes ( $\pm$ SEM) des différences de temps passés dans les compartiments avant et après conditionnement (barres rayées : conditionnement à l'héroïne ; barres vides : conditionnement au véhicule) <sup>(28)</sup>.

- Le temps de conditionnement : Celui-ci dépendra des caractéristiques pharmacocinétiques et pharmacodynamiques de la substance à tester ainsi que de la voie d'administration et de la forme galénique. La plupart des articles font état de temps de conditionnement entre 15 et 30 minutes. Seuls quelques-uns utilisent des temps plus longs et les résultats ne sont pas forcément meilleurs. Dans son étude paramétrique utilisant de l'héroïne par voie intraveineuse <sup>(28)</sup>, M.A. Bozarth a testé les temps 10, 30 et 100 minutes, et a remarqué qu'une réponse maximale était observée pour une durée de conditionnement de 30 minutes. Une durée trop importante de conditionnement peut engendrer la création d'un sentiment de répulsion pour l'environnement et donc diminuer la force de l'association (figure 9).

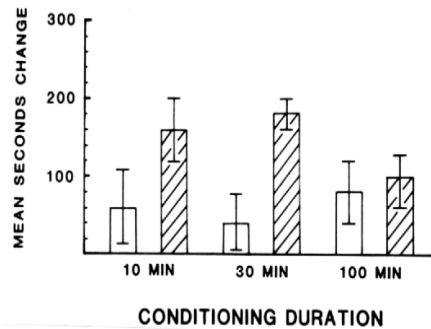


Figure 9 : Influence de la durée des essais de conditionnement sur la force de la réponse.

La figure présente les moyennes ( $\pm$ ESM) des différences de temps passés dans les compartiments avant et après conditionnement (barres rayées : conditionnement à l'héroïne, barres vides : conditionnement au véhicule) <sup>(28)</sup>.

- Le type de conditionnement : Les protocoles de conditionnement rencontrés lors de la recherche bibliographique peuvent en général être classés en deux types principaux. En effet, les sessions de conditionnement avec la substance puis avec le véhicule peuvent se dérouler soit dans la même journée (conditionnement matin puis après midi) soit sur trois jours. Les deux types de conditionnement sont très employés mais la pharmacocinétique et la pharmacodynamie des molécules à tester sont des facteurs primordiaux dans le choix du protocole.
- Temps de test : Celui-ci n'excède pas la durée de conditionnement. M.A. Bozarth a analysé la préférence de place des animaux minute par minute pendant 15 minutes au total et observe que « la réponse des animaux est significative pendant les 10 premières minutes » <sup>(28)</sup>. Cependant la plupart des auteurs utilisent des durées de test supérieures à 10 minutes (figure 10).

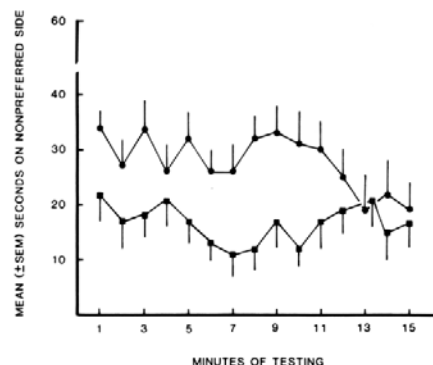


Figure 10 : Changement de préférence de place pendant une période de 15 minutes. Chaque point représente la moyenne ( $\pm$ ESM) de temps passé du côté le moins appétant. Les cercles représentent les rats conditionnés à l'héroïne et les carrés représentent les rats conditionnés au véhicule. Un changement dans la préférence de place des animaux est noté à partir du temps 10min <sup>(28)</sup>.

#### *d. Avantages*

La technique de préférence de place présente plusieurs avantages :

- Le rat est testé sans drogue, ce qui évite les biais dus aux effets de la drogue sur la mémoire, sur l'activité locomotrice, ou sur la perception de l'animal de son environnement <sup>(28, 180)</sup>.
- La technique est non invasive, contrairement à la technique d'auto-administration, et provoque un moindre stress à l'animal <sup>(28, 35, 58, 141, 180)</sup>.
- La technique permet de caractériser à la fois les effets renforçants et les effets aversifs <sup>(28, 35)</sup>.
- L'activité locomotrice peut être quantifiée simultanément par enregistrement du parcours de l'animal dans la cage de préférence de place.
- Une courbe dose-réponse peut être obtenue <sup>(28, 35)</sup>, permettant la mise en évidence d'un effet seuil.
- Elle permet de caractériser les propriétés d'associations des drogues <sup>(28, 35, 58)</sup>.
- Elle permet aussi dans certaines conditions d'apprécier l'aspect modulateur que peuvent avoir certaines substances pharmacologiques <sup>(81, 129, 146, 205)</sup> ou certaines conditions expérimentales <sup>(87, 174)</sup>.
- La réponse est prédictive du comportement humain. Le même principe peut être réalisé sur l'homme <sup>(58)</sup>.

#### *e. Inconvénients*

- Compte tenu d'une variabilité plus importante, le nombre d'animaux à tester plus important que pour les techniques d'auto-administration.
- Des effets de la substance sur la mémoire ou sur l'activité locomotrice peuvent entraîner un biais important dans les résultats.
- Un comportement d'exploration très important peut diminuer la sensibilité du test.
- Les contrôles doivent être bien établis avant le conditionnement car l'animal peut présenter une préférence spontanée pour l'un des deux contextes.

## II.1.3 Auto-administration

Dans l'évaluation du potentiel de dépendance, les techniques d'auto-administration sont les plus couramment utilisées car elles mettent en évidence le comportement spontané de consommation de la substance.

Ces techniques voient le jour dans les années 1960 <sup>(177, 189, 190)</sup> grâce au développement des cathéters intraveineux permettant une administration chronique <sup>(133, 202)</sup>.

En 1962, Weeks <sup>(189)</sup> réalise la première expérience d'auto-administration chez le rat. Sa méthode fut alors modifiée et adaptée pour le singe rhésus <sup>(62, 177)</sup>, le singe écureuil <sup>(80, 175)</sup>, le cochon <sup>(16)</sup>, le chien <sup>(102)</sup>, le babouin <sup>(83, 85, 117)</sup>, le chat <sup>(10)</sup>, et la souris <sup>(53, 133, 202)</sup>.

Le modèle est très documenté et de nombreuses substances ont fait et font encore aujourd'hui l'objet d'expérimentation sur ce modèle (tableau 1).

### a. Principe du test

Ce test découle du conditionnement de type II. L'animal va apprendre que l'appui sur une pédale/levier entraîne la distribution d'un agent présentant des propriétés de renforcement.

L'animal est placé dans un boîte de Skinner et lors des premières séances il découvre la cage. Il activera fortuitement la pédale et recevra une injection de drogue (figures 11 et 12).

Si les effets de celle-ci sont agréables, le rat va augmenter ses réponses afin de s'injecter de plus en plus de substance <sup>(171, S18)</sup>.



Figure 11 : Photographie d'un rat dans une cage d'auto-administration. Une pression sur le levier délivre une dose de nourriture ou de drogue.

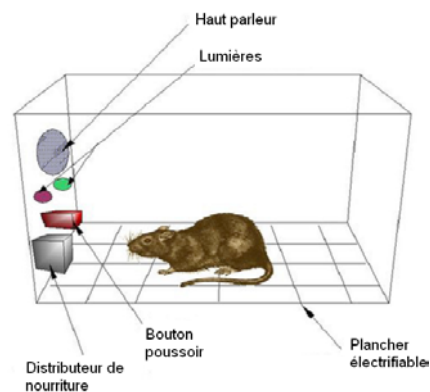


Figure 12: Schéma d'une cage de conditionnement opérant. Une pression sur le levier délivre une dose d'agent renforçant (nourriture).

Tableau 1 : Substances et espèces utilisées dans des tests d'autoadministration (202)

| <i>Exemples de substances maintenant une auto-administration intraveineuse chez l'animal</i> |                |                            | <i>Exemples de substances ne maintenant pas d'auto-administration intraveineuse chez l'animal</i> |                |                            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|----------------------------|
| Substance                                                                                    | Espèce         | Reference                  | Substance                                                                                         | Espèce         | Reference                  |
| d-Amphetamine                                                                                | Babouin        | Griffiths et al., 1975     | Amitriptyline                                                                                     | Singe Rhésus   | Hoffmeister, 1977          |
|                                                                                              | Chien          | Risner & Jones, 1975       | Aspirine                                                                                          | Singe Rhésus   | Hoffmeister & Wuttke, 1973 |
|                                                                                              | Rat            | Pickens, 1968              | Buspirone                                                                                         | Singe Rhésus   | Balster & Woolverton, 1982 |
|                                                                                              | Singe Rhésus   | Deneau et al., 1969        | Caféine                                                                                           | Singe Rhésus   | Hoffmeister & Wuttke, 1973 |
| Barbital                                                                                     | Singe-écureuil | Stretch & Gerber, 1970     | Chlordiazepoxide                                                                                  | Singe Rhésus   | Balster & Woolverton, 1982 |
| Buprenorphine                                                                                | Singe Rhésus   | Winger et al., 1975        |                                                                                                   | Rat            | van Ree et al., 1978       |
| Caféine                                                                                      | Rat            | Lukas et al., 1984         | Chlorpromazine                                                                                    | Singe Rhésus   | Deneau et al., 1969        |
|                                                                                              | Singe Rhésus   | Atkinson & Enslen, 1976    |                                                                                                   | Singe-écureuil | Gill et al., 1973          |
| Chlordiazepoxide                                                                             | Singe Rhésus   | Deneau et al., 1969        | Clonazépam                                                                                        | Babouin        | Griffith et al., 1981      |
| Clonidine                                                                                    | Rat            | Yanagita & Takahashi, 1973 | Clorazépate                                                                                       | Babouin        | Griffith et al., 1981      |
|                                                                                              | Babouin        | Shearman et al., 1977      |                                                                                                   | Singe Rhésus   | Balster & Woolverton, 1982 |
| Cocaïne                                                                                      | Chat           | Griffiths et al., 1975     |                                                                                                   | Rat            | Collins et al., 1984       |
|                                                                                              | Porc           | Balster et al., 1976       | Cyclazocine                                                                                       | Singe Rhésus   | Aigner & Balster, 1979     |
|                                                                                              | Rat            | Bedford, 1973              | Diazépam                                                                                          | Babouin        | Griffiths et al., 1981     |
|                                                                                              | Singe Rhésus   | Pickens, 1968              | Ethanol                                                                                           | Rat            | Collins et al., 1984       |
| Codéine                                                                                      | Singe-écureuil | Deneau et al., 1969        |                                                                                                   | Babouin        | Griffiths et al., 1976     |
|                                                                                              | Rat            | Goldberg, 1973             |                                                                                                   | Chien          | Risner & Silcox, 1981      |
|                                                                                              | Singe Rhésus   | Collins & Weeks, 1965      | Fenfluramine                                                                                      | Rat            | Baxter et al., 1973        |
|                                                                                              | Singe Rhésus   | Deneau et al., 1969        |                                                                                                   | Singe Rhésus   | Woods & Tessel, 1974       |
| Diazépam                                                                                     | Singe Rhésus   | Yanagita & Takahashi, 1973 |                                                                                                   | Singe-écureuil | Gill et al., 1973          |
| Ethanol                                                                                      | Rat            | Smith & Davis, 1974        | Flurazépam                                                                                        | Babouin        | Griffiths et al., 1981     |
| Fentanyl                                                                                     | Singe Rhésus   | Deneau et al., 1969        | Haloperidol                                                                                       | Singe Rhésus   | Hoffmeister, 1977          |
| Haloperidol                                                                                  | Rat            | Shearman et al., 1977      | Imipramine                                                                                        | Singe Rhésus   | Yanagita et al., 1972      |
| Héroïne                                                                                      | Rat            | Glick & Cox, 1975a         | Mescaline                                                                                         | Singe Rhésus   | Deneau et al., 1969        |
|                                                                                              | Singe Rhésus   | Blakesley et al., 1972     | l-Methamphetamine                                                                                 | Singe-écureuil | Gill et al., 1973          |
|                                                                                              | Babouin        | Harrigan & Downs, 1978     | Midazolam                                                                                         | Babouin        | Griffiths et al., 1981     |
| Ketamine                                                                                     | Babouin        | Lukas et al., 1984b        | Morphine                                                                                          | Porc           | Bedford, 1973              |
|                                                                                              | Chien          | Risner, 1982               | Nalorphine                                                                                        | Singe Rhésus   | Deneau et al., 1969        |
| Méthadone                                                                                    | Singe Rhésus   | Moreton et al., 1977       |                                                                                                   | Rat            | van Ree et al., 1978       |
|                                                                                              | Rat            | Collins & Weeks, 1965      | Naloxone                                                                                          | Singe Rhésus   | Goldberg et al., 1971a     |
|                                                                                              | Singe Rhésus   | Harrigan & Downs, 1978     | Phénobarbital                                                                                     | Rat            | Collins et al., 1984       |
|                                                                                              | Chat           | Balster et al., 1976       | Scopolamine                                                                                       | Rat            | Glick & Cox, 1975b         |
| d-Methamphetamine                                                                            | Rat            | Pickens et al., 1967       |                                                                                                   | Singe Rhésus   | Aigner & Balster, 1979     |
|                                                                                              | Singe Rhésus   | Deneau et al., 1969        | Delta 9 THC                                                                                       | Singe Rhésus   | Harris et al., 1974        |
|                                                                                              | Singe-écureuil | Gill et al., 1973          |                                                                                                   |                |                            |
|                                                                                              | Babouin        | Griffiths et al., 1975     |                                                                                                   |                |                            |
| Methylphenidate                                                                              | Chien          | Risner & Jones, 1975       |                                                                                                   |                |                            |
|                                                                                              | Singe Rhésus   | Wilson et al., 1971        |                                                                                                   |                |                            |
|                                                                                              | Chien          | Jones & Prada, 1973        |                                                                                                   |                |                            |
|                                                                                              | Souris         | Criswell & Ridings, 1983   |                                                                                                   |                |                            |
| Morphine                                                                                     | Rat            | Weeks, 1962                |                                                                                                   |                |                            |
|                                                                                              | Singe Rhésus   | Thompson & Schuster, 1964  |                                                                                                   |                |                            |
|                                                                                              | Singe-écureuil | Goldberg et al., 1979      |                                                                                                   |                |                            |
|                                                                                              | Babouin        | Ator & Griffiths, 1983     |                                                                                                   |                |                            |
| Nicotine                                                                                     | Chien          | Risner & Goldberg, 1981    |                                                                                                   |                |                            |
|                                                                                              | Rat            | Lang et al., 1977          |                                                                                                   |                |                            |
|                                                                                              | Singe Rhésus   | Deneau & Inoki, 1967       |                                                                                                   |                |                            |
|                                                                                              | Singe-écureuil | Goldberg et al., 1981      |                                                                                                   |                |                            |
| Pentobarbital                                                                                | Babouin        | Griffiths et al., 1981     |                                                                                                   |                |                            |
|                                                                                              | Rat            | Collins et al., 1984       |                                                                                                   |                |                            |
|                                                                                              | Singe Rhésus   | Deneau et al., 1969        |                                                                                                   |                |                            |
|                                                                                              | Babouin        | Lukas et al., 1984         |                                                                                                   |                |                            |
| Phencyclidine (PCP)                                                                          | Chien          | Risner, 1982               |                                                                                                   |                |                            |
|                                                                                              | Rat            | Carroll et al., 1979       |                                                                                                   |                |                            |
|                                                                                              | Singe Rhésus   | Balster et al., 1973       |                                                                                                   |                |                            |
| Delta 9 THC                                                                                  | Rat            | Takahashi & Singer, 1979   |                                                                                                   |                |                            |
|                                                                                              | Singe Rhésus   | Pickens et al., 1973       |                                                                                                   |                |                            |



### b. Réalisation du test

La technique se décompose en plusieurs phases:

- Chirurgie : un cathéter est tout d'abord implanté dans l'animal par voie intracardiaque, intraveineuse (veine jugulaire, veine fémorale), intragastrique <sup>(122)</sup> ou intracérébrale <sup>(29)</sup> ; la voie orale est possible et d'une réalisation plus aisée mais moins fréquemment utilisée à cause de la variabilité dans l'absorption <sup>(2, 133, 156)</sup>. En général les drogues sont introduites par voie intraveineuse à l'aide d'un cathéter implanté pour s'assurer d'une biodisponibilité de 100%. Les administrations se réalisent alors par la veine jugulaire externe.
- Conditionnement opérant : l'animal naïf est ensuite placé dans une boîte de Skinner et relié à un système d'injection qu'il déclenchera par l'appui sur une pédale ou par la pression sur un bouton avec le museau (figure 13).

Deux procédures d'auto-administration sont couramment utilisées:

- o Continue ou directe : l'animal a immédiatement accès à la substance. Elle correspond à la procédure de base permettant de déterminer si un animal va s'auto-injecter la substance. Si oui, elle permet d'évaluer comment la réponse varie au cours du temps.
- o Substitution : le comportement d'auto-administration est tout d'abord établi avec un composé de référence (morphine, cocaïne) connu pour avoir des propriétés de renforcement. Lorsque son auto-administration est comme stabilisée, l'animal est considéré physiquement dépendant ; la substance-test est alors substituée à la substance de référence. On mesure alors l'absorption, le temps de réponse et la stabilité de la réponse.

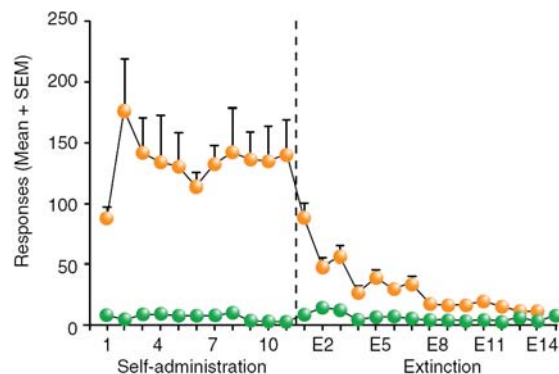


Figure 13 : Développement et phase d'extinction d'une addiction chez un modèle animal. Dans la première phase, les animaux sont entraînés à s'autoadministrer la cocaïne en pressant sur le levier. Dans la seconde phase, une pression sur le levier n'entraîne pas de libération de substance (phase d'extinction). En vert véhicule, en orange, cocaïne <sup>(105)</sup>.

Selon les procédures, le potentiel de dépendance est représenté par différents paramètres <sup>(132, 133, 171)</sup> :

- Procédure « Ratio Progressif » : Tout d'abord, l'animal acquiert la performance opérante grâce à l'aide de la substance aux propriétés renforçante. Ensuite le nombre de réponses nécessaires pour la délivrance de la substance aux propriétés renforçantes augmente progressivement. Le plus haut rapport à laquelle la performance est maintenue est nommé « point de rupture ». Hodos <sup>(89, 90)</sup> a démontré que plus la concentration ou le volume de substance de renforcement était important, plus le point de rupture était élevé. Par conséquent, le point de rupture peut être utilisé pour représenter la force de renforcement de la substance.
- Analyse du taux de réponse : La force relative de chaque substance peut être mesurée par rapport à la ligne de base d'auto-administration de chaque animal. Si une corrélation négative est démontrée entre la dose de drogue et le taux de réponse <sup>(64, 80, 143)</sup>, il faut utiliser une procédure continue ou a low fixed ratio. Si une corrélation positive est observée entre l'augmentation de la dose et le taux de réponse, l'utilisation de procédures à intervalle fixé (fixed-interval schedule) <sup>(11)</sup> combinée avec une période réfractaire après chaque injection s'impose. Une procédure à intervalle fixé (fixed-ratio schedule) avec une longue période réfractaire peut aussi être utilisée <sup>(84)</sup>. Pour des hautes doses, le taux de réponse va diminuer pendant l'effet pharmacodynamique de la drogue.
- Procédure de choix : Il est possible de laisser le choix à l'animal entre plusieurs doses ou différentes drogues. Par exemple, des couleurs différentes sont associées à différents dosages ou différentes drogues. Après une exposition initiale à une seule <sup>(31)</sup> ou à deux drogues <sup>(101)</sup>, l'animal a la possibilité d'effectuer un choix en activant un troisième levier. La disponibilité de la drogue peut être indiquée par l'illumination d'une diode ou par un stimulus auditif. Un seul choix est possible en même temps.  
Le pourcentage de choix d'une drogue ou d'une dose par rapport à une autre ainsi que le taux de réponse déterminent la force de renforcement. Les deux drogues ou les deux doses peuvent être disponibles de façon simultanée (concurrence).

### c. Paramètres (15, 112, 132)

- Rapport fixe « fixed ratio » (FR) : il correspond au nombre de réponses nécessaires pour obtenir le renforcement (délivrance d'une dose de substance). Une augmentation du FR augmente la sensibilité de la procédure, mais peut parfois entraîner une diminution de la réponse de l'animal (202).
- La dose administrée et la voie d'administration (115), qui conditionnent la biodisponibilité.
- La durée de session par jour est un paramètre qui a un impact direct sur les effets délétères de la substance testée.
- Temps de réfraction « time out » (TO) : il correspond au temps pendant lequel les réponses sur le levier actif n'auront plus de conséquences. L'animal peut alors profiter de son renforcement sans que ceux-ci ne soient délivrés trop rapidement. L'augmentation de ce TO doit être progressive.
- Les modèles de consommation spontanée (38, 118, 132).  
Quand l'auto-administration est instaurée, des modèles de prise de substance sont souvent mis en évidence. Le comportement de prise de drogue perdure pendant quelques jours, puis l'animal s'impose spontanément une période d'abstinence de quelques heures à quelques jours, période pendant laquelle peuvent apparaître des signes de sevrage. Une nouvelle période de consommation de drogue peut alors débuter.

Si la drogue est disponible *ad libitum*, cette alternance peut être observée pendant des semaines voire des mois. Pendant les périodes de prise de drogue, les signes comportementaux peuvent augmenter (mouvements stéréotypiques avec hypoactivité), associés à une diminution de la consommation de nourriture et d'eau.

Ces modèles d'alternance entre des phases de prise de drogue et d'abstinence ont été reportés pour l'amphétamine, la méthamphétamine (62, 142, 201), la cocaïne (62, 99), la caféine (62), la fencamphamine et SPA (70), le méthylphénidate, la phenmetrazine (152, 153), le diéthylpropion (100), le mazindol (154) et l'éthanol (195).

L'auto-administration de pentobarbital est caractérisée par l'absence de période d'abstinence. Les primates consomment le maximum de substance qu'ils peuvent le supporter physiquement (62, 199).

L'auto-administration intraveineuse d'opioïdes présente des résultats plus réguliers avec une consommation pendant le jour et une consommation diminuée en soirée. Les animaux ne présentent pas d'abstinence volontaire aux opioïdes (62, 86).

L'auto-administration de phencyclidine, si disponible *ad libitum*, résulte en des périodes de sévère intoxication en alternance avec des périodes d'intoxication moyenne pendant lesquelles l'animal se nourrit (9, 12).

Presque toutes les drogues auto-administrées par voie intraveineuse présentent le risque d'induire une intoxication aiguë voire de mort pendant ces phases d'accès illimité. Des convulsions et automutilations ont pu être observées avec les stimulants (62, 201) ; de sévères intoxications et des dépressions respiratoires ont été observées avec l'éthanol, les barbituriques et les opioïdes (38, 62, 86, 195). Des convulsions ont été observées avec la codéine (62). L'accès *ad*

*libitum* aux stimulants et aux dépresseurs entraîne une augmentation de la mortalité. Pour ces raisons, et à cause des risques de toxicité chroniques et sub-chroniques, la disponibilité de la substance active peut et doit être limitée.

Par conséquent, Les doses sont choisies de façon pertinente en fonction de leur pharmacocinétique et de leur pharmacodynamie. Typiquement, la drogue peut être disponible pour seulement quelques heures (de 1 à 6 heures) pendant les sessions journalières ou pendant les sessions moins fréquentes (drogues à longue durée d'action) <sup>(133)</sup>.

#### *d. Avantages*

- Ce modèle se rapproche le plus du modèle de prise compulsive par l'homme <sup>(123, 155)</sup>. Il permet la mise en évidence des abstinences spontanées <sup>(110)</sup>.
- Les propriétés de renforcement des drogues traduites par un comportement actif de l'animal augmentant ainsi la prédictibilité des résultats.
- La technique est sensible, même à de très faibles doses.
- Possibilité de travailler sur les composantes neuro-anatomiques et de prédisposition de l'auto-administration.
- Après cette expérience de la drogue, les animaux développeront un comportement d'auto-administration compulsif même pour de très faibles doses, qui sont inefficaces chez les témoins. Par ailleurs, ils manifesteront cette vulnérabilité de façon définitive.
- Les substances peuvent être classées selon leur potentiel de dépendance.
- Ce modèle est très documenté.

#### *e. Inconvénients <sup>(S18)</sup>*

- La variabilité inter-laboratoire est importante ; il est donc nécessaire de témoins positif et négatif (recommandés par la ligne directrice de toute façon). Les témoins positifs correspondent aux substances de référence de la classe chimique ou pharmacologique de la substance à tester. Une procédure standardisée doit systématiquement être mise en place.
- Une gamme de dose étendue est nécessaire pour mettre en évidence les effets.
- La procédure chirurgicale nécessite des compétences spécifiques et un suivi clinique approprié.
- Une substance induisant une dépression du SNC diminuera le taux de réponse perturbant ainsi l'interprétation.
- Dans le cas de la procédure de substitution, les effets de la drogue d'entraînement doivent être pris en considération lors de l'interprétation.

## II.1.4 Discrimination

Les procédures de discrimination ont apporté des informations très utiles aux techniques d'auto-administration <sup>(133, 202)</sup>. Elles sont créées spécialement pour utiliser les altérations physiologiques et intéroceptives induites par les drogues comme des signaux d'une réponse appropriée pour obtenir de la nourriture ou pour éviter un choc électrique <sup>(136)</sup>. Et peuvent donc être très proche des réactions chez les humains <sup>(131, 133, 147)</sup>.

Les espèces animales communément utilisées sont les primates <sup>(6, 8, 121)</sup> et les rongeurs <sup>(8, 67, 202)</sup> mais les oiseaux peuvent aussi être utilisés <sup>(91, 92, 151)</sup>.

De nombreuses molécules sont couramment utilisées, telles que les benzodiazépines <sup>(6, 8, 121, 202)</sup>, la morphine <sup>(67, 185)</sup>, les stimulants du SNC <sup>(106)</sup> ou d'autres substances neuro-actives <sup>(121, 160)</sup>.

### a. Principe du test

Pendant une période d'entraînement, l'animal associe l'administration de la drogue avec une pression sur le levier A et l'administration du véhicule avec une pression sur le levier B. Le renforcement peut être positif et se réalise alors par distribution de nourriture dans le cas d'une association correcte. Il peut être négatif et se réalise alors par une décharge électrique de faible intensité (figure 14).

La procédure basique implique l'entraînement d'animaux à répondre différemment selon la nature du pré traitement soit dans un labyrinthe en T (ou T maze) (à droite si drogue, à gauche si véhicule) ou dans une cage à double choix (levier droit délivre de la nourriture ou pas de choc électrique si drogue et levier gauche délivre nourriture ou pas de choc si véhicule).

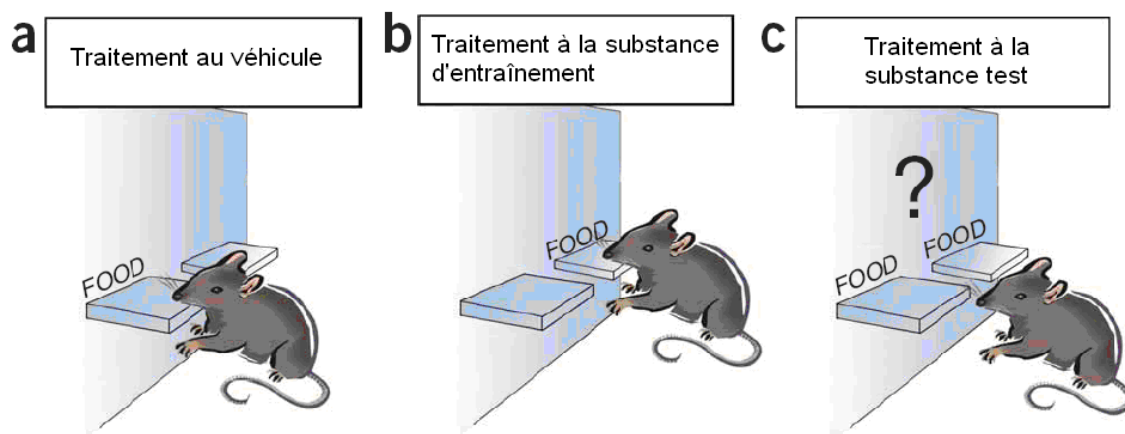


Figure 14 : Principe du test de discrimination :

- (a,b) Pendant l'entraînement, un levier délivre de la nourriture lorsque le rat a été traité par le véhicule. L'autre levier délivre de la nourriture lorsque le rat a été traité par la substance d'entraînement.
- (c) Pendant les sessions de test, le rat reçoit une substance-test seule (test de généralisation) ou en association avec la substance d'entraînement (test de blocage) afin de déterminer quel levier il va presser. Afin de diminuer les biais, les deux leviers distribuent de la nourriture pendant les sessions de test <sup>(172)</sup>.

Plusieurs concepts basiques peuvent être suivis (43, 131, 133, 172) :

- Test de généralisation (figure 15) : détection des effets similaires à ceux d'une drogue d'entraînement. Si le rat répond par le levier correspondant à la drogue d'entraînement, on dit qu'il généralise la substance test à la drogue d'entraînement. On peut utiliser d'autres drogues de même classe pharmacologique pour prouver la spécificité pharmacologique de la réponse. Tous les résultats doivent être interprétés en tenant compte de la drogue d'entraînement, car celle-ci peut affecter les résultats obtenus (188). On peut également utiliser des molécules tests de classes pharmacologiques différentes. Généralement, les drogues de même classe pharmacologique que la drogue d'essai entraînent une réponse similaire à celle de la substance d'entraînement alors que des drogues de classe pharmacologique différente entraînent une réponse différente (48).

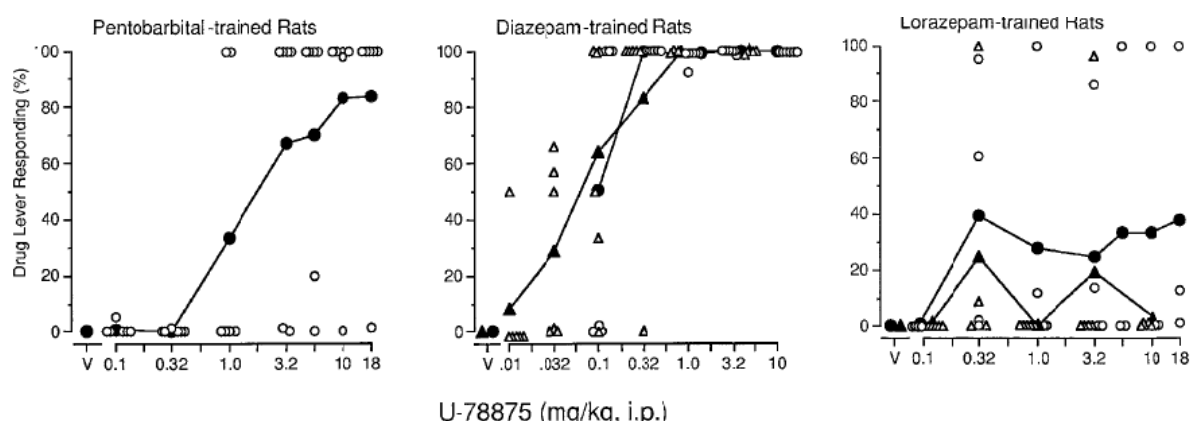


Figure 15 : Généralisation de la substance U-78875 chez les rats entraînés à discriminer le pentobarbital (n=6), le diazépam (n=12) ou le lorazépam (n=10) du véhicule (ND). Les graphiques présentent les pourcentages de réponses sur le levier associé à l'anxiolytique d'entraînement. Les symboles pleins représentent les moyennes et les symboles vides représentent les données individuelles. Les triangles représentent les données des animaux sans historique de traitement (8).

- Test de blocage (figure 16) : détection des altérations d'un traitement induites par la substance test. La substance test peut être administrée avec la drogue d'entraînement afin de détecter des substances qui pourraient avoir des effets antagonistes ou synergiques. Ce type de test apporte des informations sur les sites d'action primaires des substances.

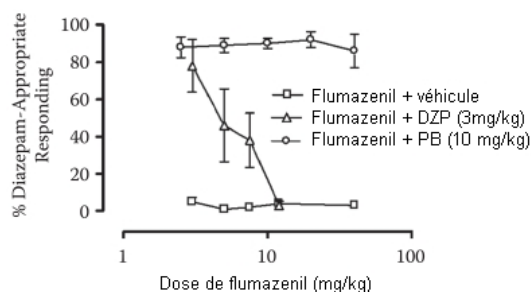


Figure 16 : Blocage de la discrimination du diazépam par des doses croissantes de flumazénil. L'administration de doses croissantes de flumazénil avant injection de diazépam produit un antagonisme progressif de l'effet de la benzodiazépine, traduit par une diminution du pourcentage de réponses sur le levier associé au diazépam. L'administration de doses croissantes de flumazénil n'affecte pas la réponse des rats traités au pentobarbital (S14).

- Étude des neurotransmetteurs impliqués dans les processus de discrimination par utilisation des agonistes/antagonistes spécifiques <sup>(67, 185)</sup>.
- Étude des influences pharmacocinétiques sur les effets de discrimination (comparaison de différentes voies d'administration de différentes doses, modification du temps de prétraitement). On peut démontrer le conditionnement de la réponse en utilisant d'autres doses de la drogue d'essai <sup>(163)</sup> pour prouver la spécificité de la réponse à la drogue.

#### *b. Réalisation du test*

Le test se décompose en trois phases :

- Apprentissage de la réponse opérante.  
Sans aucun traitement, le rat apprend à appuyer sur le levier pour obtenir le renforcement (réponse opérante). Cette phase est critique et nécessite l'attention du manipulateur.
  - o Les leviers sont retirés et la nourriture est délivrée automatiquement avec un signal sonore (un granulé toutes les 60 sec environ), indépendamment du comportement de l'animal. Le rat apprend ainsi où se trouve le renforcement et associe le signal sonore à l'arrivée du renforcement.
  - o Les leviers sont alors replacés et le renforcement (nourriture) est délivré à chaque pression quel que soit le levier. En fonction des réponses de l'animal, le rapport de réponse ou FR (fixed-ratio) et le temps de réfraction ou TO (time out) peuvent alors être progressivement augmentés. Le mieux est d'augmenter ces paramètres pendant une même session après que l'animal ait montré des réponses satisfaisantes.
  - o Il est important d'habituer le rat à ne pas presser toujours même levier. Pour cela, un seul levier peut être mis à disposition pour délivrer la nourriture (retirer alternativement un levier puis l'autre) et le renforcement peut venir aléatoirement de la pression sur un levier ou sur l'autre.
- Acquisition de la discrimination.  
La substance d'entraînement ou le véhicule est injecté lorsque le conditionnement opérant a bien été acquis et est stabilisé. Le véhicule et la substance doivent être administrés à la même fréquence, pour ne pas entraîner de préférence pour l'un des leviers et l'administration doit alors être équivalente (simple alternance ou double alternance) en prenant garde aux phénomènes de tolérance et de sensibilisation. L'entraînement à la discrimination dure généralement 3-4 mois. En cas d'échec après 4-5 mois, les animaux peuvent être remplacés. L'acquisition de la discrimination est déterminée par deux paramètres constants pendant 8-10 sessions <sup>(43, 172)</sup> :
  - o le pourcentage de réponses correctes pendant la session (>80%)
  - o le nombre de pressions sur le levier incorrect pendant le premier essai (<50%)
- Test d'une nouvelle substance et conservation de la discrimination.  
Lorsque la discrimination est bien instaurée, il est possible de réaliser des tests de différentes doses de la substance d'entraînement, afin d'obtenir une courbe dose-réponse. Le test de nouvelle substance débute alors. Solinas <sup>(172)</sup> recommande des cycles basés sur deux semaines (tableau 2).

A la fin des tests, il faut réaliser une nouvelle courbe dose-réponse afin de vérifier que le contrôle de discrimination n'a pas changé.

Tableau 2 : exemple de planning de traitement

| Lundi | Mardi | Mercredi | Jeudi | Vendredi | Samedi | Dimanche | Lundi | Mardi | Mercredi | Jeudi | Vendredi |
|-------|-------|----------|-------|----------|--------|----------|-------|-------|----------|-------|----------|
| D     | T     | V        | D     | T        |        |          | V     | T     | D        | V     | T        |

D=drogue d'entraînement,  
T=substance test, et  
V=véhicule

Interprétation des résultats : Quand une substance produit les mêmes effets que la drogue d'entraînement, les rats bien entraînés vont choisir le levier approprié. Ce phénomène est appelé « généralisation ». Quand la dose de la drogue d'entraînement varie au cours des sessions, le choix sur le levier approprié est représenté par une courbe sigmoïde en fonction de la dose (allant de 0 à 100%) (figure 17).

Les rats vont choisir le levier associé au véhicule si la substance de test produit des effets différents de ceux de la drogue d'entraînement, si la dose est trop faible ou si la substance-test bloque les effets discriminants de la drogue d'entraînement (« blocage »).

La généralisation est considérée comme totale si le taux de réponses sur le levier associé à la drogue d'entraînement est supérieur à 80%. Si ce taux est inférieur à 20%, l'antagonisme ou blocage est considéré comme total. Chaque animal est comparé à lui-même.

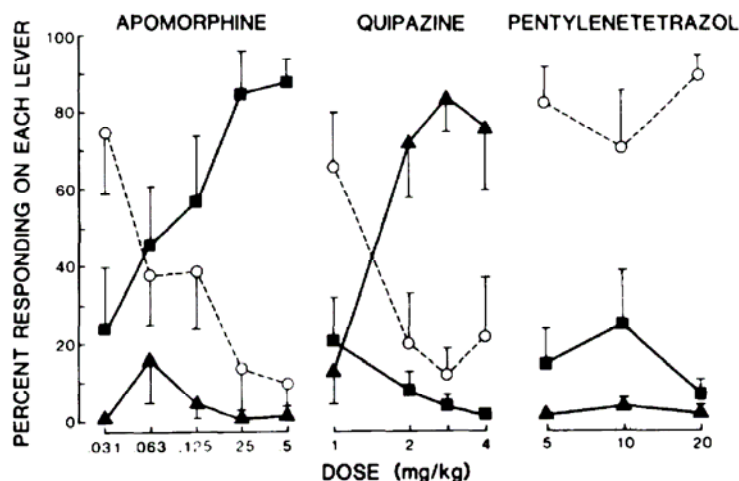


Figure 17 : Résultats du test de substitution (généralisation) avec de l'apomorphine, (à gauche), de la quipazine (au centre), et du pentylentétrazol (à droite) chez des rats entraînés à discriminer du LSD (0.08 mg/kg) du lisuride (0.04 mg/kg) et du sérum physiologique. Les triangles représentent le pourcentage de réponses sur le levier "LSD". Les carrés représentent le pourcentage de réponses sur le levier "lisuride". Les cercles représentent le pourcentage de réponses sur le levier "sérum physiologique" (131).



### c. Méthodes

Deux méthodes basiques ont été employées :

- Punition négative = Évitement du choc <sup>(165)</sup> : L'animal doit apprendre à presser deux leviers, le premier qui « débute », puis le deuxième approprié à l'autre bout de la cage pour éviter le choc électrique. Le levier approprié est déterminé par le traitement (levier gauche si véhicule, levier droit si drogue). Les autres substances sont alors testées sur une large gamme de doses. L'entraînement continue jusqu'à un taux de réponse correcte de 90%.
- Renforcement positif = Présentation de nourriture <sup>(88)</sup> : Les animaux sont maintenus en restriction alimentaire (80-90% du poids sans restriction) puis ensuite entraînés à presser un ou deux leviers pour recevoir de la nourriture <sup>(88, 198)</sup>. Le levier approprié dépend du traitement (droite pour véhicule et gauche pour drogue). L'entraînement continue jusqu'à un taux de réussite de 90%.

### d. Paramètres <sup>(43, 131, 133, 151, 172, 202)</sup>

- Rapport fixe « Fixed-ratio » (FR)  
C'est le nombre de réponses nécessaires pour obtenir une unité de renforcement (nourriture...). Une augmentation du FR augmente la sensibilité de la procédure. Le FR est arbitraire mais la plupart des études utilisent un FR10, c'est à dire que le renforcement est délivré après dix pressions sur le levier approprié. Cette valeur est suffisamment élevée pour que la réponse n'interfère pas avec les pressions involontaires ou hasardeuses mais assez basse pour que les animaux puissent le réaliser rapidement. Pour réduire les erreurs de levier, quelques chercheurs jugent utile de remettre à zéro le nombre de pressions nécessaires pour le renforcement si une seule pression sur le mauvais levier est réalisée.
- Temps de réfraction « Time out » (TO)  
C'est le temps pendant lequel les réponses sur le levier actif n'auront plus de conséquences. L'animal peut alors profiter de son renforcement (nourriture) sans que ceux ci ne soient délivrés trop rapidement. Des TO courts (5 s) sont utilisés pendant la formation puis une valeur plus importante (30-60 s) est généralement utilisée pour les phases de test. L'augmentation de ce TO doit être progressive.
- Nombre d'essais par session  
Un essai est une partie d'une session qui se termine par la délivrance d'un granulé de nourriture. Le nombre d'essai est arbitraire et peut être choisi selon les exigences de l'étude. Généralement, les auteurs utilisent vingt essais par session, ce qui permet au rat un nombre raisonnable d'essais avant la satiété. Il peut être augmenté ou diminué sans impact sur la performance de discrimination, mais il est habituellement maintenu constant de l'entraînement à la phase de test.
- Durées des sessions de discrimination  
Elles se terminent quand le rat a réalisé le nombre maximal d'essais ou quand la durée maximale est atteinte. Celle-ci doit être déterminée à partir des caractéristiques pharmacocinétiques de la substance d'entraînement, et ne doit pas varier entre les sessions d'entraînement et de test. La durée de la session doit permettre une marge de temps confortable pour que le nombre d'essai soit réalisé dans les mêmes conditions que pour la ligne de base. Par exemple, vingt essais

suivis de 45 s TO et si la durée maximale de la session est de 30 min, alors il y aura 15 min de temps effectif de réponse. Une session trop courte trop est sensible à l'effet pharmacodynamique de la drogue (benzodiazépine → pas assez de réponse, animaux en dépression). Une session trop longue sera insensible à l'effet des drogues à action courte, car les effets se seront dissipés avant la fin de la session.

- Choix des doses / Range de doses pour les substances-test  
Dans les études de discrimination, les substances test sont évaluées sur un large éventail de dose. Il faut éviter un maximum l'utilisation de doses qui entraînent une diminution du taux de réponse. Les animaux entraînés représentent un investissement en temps considérable, ils doivent par conséquent être protégés contre les effets toxiques aigus des drogues. En cas d'absence de donnée bibliographique sur les effets d'une dose importante de substance, il est conseillé de tester la substance sur les animaux non entraînés d'abord.
- Nombre de prétraitement  
Ils doivent être choisis selon l'effet attendu pendant la session expérimentale. L'effet de la substance doit être présent tout au long de la session.
- Augmentation de la dose de substance test  
Elle doit se faire jusqu'à une diminution du taux de réponse.
- Réponse quantitative/qualitative  
La réponse qualitative correspond au « tout ou rien », la quantitative est présentée sous forme de pourcentage (de 0 à 100%). Si la réponse est considérée comme qualitative, le paramètre à surveiller est la sélection du levier pendant la première session. Le rat entraîné ne presse qu'un levier donc il répète généralement cette pression...
- Premier choix de levier/pourcentage total de choix du levier  
Les rats entraînés continuent généralement à presser sur le même levier que celui sélectionné pendant le premier essai. Dans ce cas, le premier choix de levier et le pourcentage total de choix du levier ne diffèrent pas. Mais parfois les rats peuvent changer de levier pendant la session. Dans tous les cas, ces deux paramètres doivent être enregistrés et analysés pendant la session expérimentale, sachant que le premier levier choisi correspond à une meilleure mesure de l'effet de discrimination.
- Sessions multiples par jour et administration cumulée  
La plupart des études de discrimination n'utilisent qu'une session par jour. Il est néanmoins possible d'en effectuer plusieurs par exemple chez le primate avec des paradigmes d'administration cumulée. Dans ce cas, les sessions multiples peuvent se réaliser successivement ou être séparées par courts intervalles (1 h). Une courbe dose-réponse peut ainsi être obtenue plus rapidement. Par contre, pour des raisons pharmacocinétiques, les effets d'une substance peuvent perdurer d'une session à l'autre. Les phénomènes d'accumulation et de clairance rendent par conséquent difficile l'évaluation de la dose efficace à l'origine des effets <sup>(133)</sup>.

#### e. *Avantages* <sup>(131, 172)</sup>

- Spécificité d'action  
La technique est hautement sensible et spécifique au niveau moléculaire (récepteur). Les substances qui ont le même site d'action auront le même résultat en discrimination (par exemple : les rats entraînés à discriminer le fentanyl répondront de la même façon à tous les agonistes  $\mu$ -opioïde). De plus, le potentiel d'une substance à produire des effets de discrimination est proportionnel à l'affinité pour le récepteur et à son activité intrinsèque <sup>(44, 46)</sup>. Leurs classes ont pu être déterminées ( $\mu$ ,  $\kappa$ ,  $\sigma$  ainsi que les agonistes/antagonistes). Les procédures de discrimination ont été utilisées pour différencier les classe d'opioïdes morphine antagonisés par naloxone ou naltrexone ; opioïdes généralisé par cyclazocine et difficiles à antagoniser et opioïdes généralisé par cyclazocine et phencyclidine et non antagonisés <sup>(91)</sup>.
- Très bonne prédictivité  
Les résultats obtenus chez l'animal sont qualitativement et quantitativement très prédictifs des résultats observés chez l'homme <sup>(65, 107, 147, 164)</sup>. Ils sont aussi extrêmement prédictifs des effets chez l'animal par rapport à la technique d'auto-administration.
- Simplicité de réalisation  
La procédure de discrimination est généralement simple à réaliser et ne requiert pas de compétences spécifiques. De plus, elle est non invasive et évite par conséquent tous les problèmes pratiques et éthiques liés à la chirurgie vétérinaire.
- Mesure des effets mécanistiques *in vivo*  
Les effets d'une substance sur le comportement peuvent provenir de plusieurs origines : la molécule (site d'action), la physiologie cellulaire (circuit neuronal) ou l'effet total (anxiété, hallucination) <sup>(47)</sup>. La discrimination permet l'investigation de l'effet total de la substance et ne se limite pas à une ou peu de cibles.
- Indépendance entre le choix et le taux de réponse  
Les taux de réponse sont indépendants des effets discriminants (exemple de la substance dépressante)
- Possibilité de comparer quantitativement les effets des différentes drogues ou mélanges ou doses  
Les animaux peuvent être entraînés à discriminer une drogue ou un mélange de son véhicule, mais aussi une dose par rapport à une autre, les effets d'une drogue des effets d'une autre drogue, et les effets d'un mélange de deux drogues des effets de chacune des drogues séparément.
- Meilleure sensibilité que les tests d'auto-administration ou de préférence de place  
Toutes les drogues ne sont pas auto-administrées chez l'animal alors qu'elles peuvent être discriminées. Par exemple, la discrimination est la méthode de choix pour les hallucinogènes.

f. *Inconvénients* (131, 172)

- Expérimentation longue et intensive  
C'est le principal désavantage de cette technique. L'animal doit être entraîné très longtemps avant de pouvoir tester de nouvelles substances ; Habituellement, 50 sessions (soit 3 mois) sont nécessaires.  
La fréquence maximale des tests est de deux par semaine et l'animal doit continuer l'entraînement pendant la phase de test. Si les animaux sont en bonne santé et si le contexte éthique le permet, ils peuvent tester des substances jusqu'à l'âge de 2 ans.  
Le niveau basal est normalement atteint au bout de quelques mois d'entraînement. Les niveaux de base de réponse chez l'animal doivent être régulièrement comparés.
- Coût de l'équipement  
Il est généralement assez dispendieux, le matériel correspond à des cages de conditionnement opérant reliées à une interface, et un logiciel d'analyse spécialisé. Solinas <sup>(172)</sup> évalue l'installation à 50000-80000\$ US, soit plus que la préférence de place (~25000\$ US) mais équivalent à l'auto-administration.
- Les animaux ne sont pas « naïfs »  
L'animal qui va tester une nouvelle drogue aura déjà été traité de façon chronique à la drogue d'entraînement et parfois de façon aiguë à une ou deux substances-test. Peuvent alors apparaître des phénomènes de tolérance ou de sensibilisation, ainsi que des phénomènes de tolérance croisée ou de sensibilisation croisée. Même si cette situation est celle retrouvée chez les consommateurs de drogues, il est important de considérer d'historique de l'animal pour une interprétation pertinente.
- Les effets de discrimination sont, au mieux, une mesure indirecte du renforcement  
Même si la drogue d'entraînement est connue pour présenter un potentiel de dépendance, il n'est pas certain que la réponse de discrimination du rat provienne de l'effet de renforcement. La technique de discrimination doit être conduite parallèlement à d'autres techniques (auto-administration).
- La discrimination est un modèle imparfait  
Il ne permet pas d'étudier l'abus de drogue comme phénomène passager ou comme état pathologique caractérisé par une perte de contrôle. C'est un inconvénient important ; la discrimination ne peut pas mimer le principal symptôme de l'addiction (défini dans le Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition DSM-IV) c'est à dire une perte de contrôle sur la consommation de drogue.
- Nécessité de multiplier les situations expérimentales et les substances positives testées pour cerner le profil de la molécule testée de façon adéquate.
- Nécessité de plusieurs doses pour caractériser tout le spectre entier d'effet <sup>(91)</sup>.

## II.2 Le syndrome de sevrage

### II.2.1 Physiologie

Les mécanismes moléculaires à l'origine d'une addiction long-terme peuvent être séparés en deux classes principales : l'apprentissage associatif et les adaptations homéostatiques.

L'apprentissage associatif correspond aux associations créées au cours de la prise d'une substance. Il est mis en évidence par les techniques dérivant du conditionnement. Celles-ci permettent notamment d'aborder l'aspect « affectif » d'une prise de substance addictive.

Les adaptations homéostatiques sont mises en évidence par le syndrome de sevrage. Elles correspondent à des réponses compensatoires de cellules ou de circuits à un bombardement excessif par une substance ou à une stimulation excessive d'un neurotransmetteur dû à une substance <sup>(S2)</sup>.

La dépendance physique correspond à un état physiologique d'adaptation à une substance suite au développement d'une tolérance chronique qui résulte en la survenue de symptômes caractéristiques de sevrage (ou d'abstinence) lors de l'arrêt de l'administration.

Le sevrage physique est la révélation des changements neurophysiologiques et/ou biochimiques qui apparaissent à l'arrêt de l'administration d'une substance.

La réaction de sevrage se présente par un état hyperadrénergique, avec de l'anxiété, de l'agitation, de la tachycardie, de l'hypertension modérée, de l'hyperacuité de tous les sens, de l'hyper-reflexie et une diminution du seuil de crise. Ce syndrome de dépendance peut être traité cliniquement par ré-administration de la substance ou d'une substance aux mêmes propriétés pharmacologiques <sup>(98)</sup>.

L'intensité des signes et symptômes de sevrage dépend de plusieurs facteurs :

- Les propriétés pharmacocinétiques de la substance utilisée;
- La dose quotidienne consommée;
- La fréquence d'administration;
- La durée d'utilisation;
- La santé et la personnalité du consommateur;

A cette dépendance physique s'ajoute la dépendance psychologique, qui explique les taux de rechute élevés lors du sevrage aux anxiolytiques ou aux opiacés.

Les délais d'apparition des symptômes de sevrage dépendent essentiellement de la pharmacocinétique de la substance. Ainsi, le syndrome de sevrage à l'héroïne, qui a une demi-vie courte, débute dès 3 et 12 heures suivant la dernière injection et devient maximum au 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> jour. Dans le cadre des produits de substitution à demi-vie plus longue (méthadone), les symptômes sont souvent atténués mais le syndrome de sevrage est maximum au 7<sup>ème</sup> jour et peut évoluer sur un mois <sup>(157)</sup>.

## II.2.2 Test de sevrage

### a. Principe du test <sup>(133)</sup>

Les effets des drogues comportent des aspects aversifs (figure 18). A la fin de l'effet d'une drogue se produit un inconfort (état de manque) qui peut aboutir à une détresse pour deux raisons :

- Par homéostasie : l'organisme contrebalance les effets euphorisants de la drogue. Lorsque l'action euphorisante disparaît la réaction subsiste quelque temps et devient d'autant plus vive que l'euphorie était intense.
- Par contraste, en raison de la réapparition du désagrément préexistant à la prise de drogue et que celle-ci a permis d'annihiler (par exemple : détresse psychologique et alcoolisme, douleur et morphine).

|                                                         |                                                                                                                                        |
|---------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Opioides</b>                                         | Malaise diffus, nervosité, frissons, myalgies, crampes abdominales, hyperalgie diffuse, diarrhées, mydriase, piloérection, bâillements |
| <b>Stimulants</b>                                       | Dépression aiguë, apathie, prostration, anhédonie, bradycardie                                                                         |
| <b>Alcools</b>                                          | Nervosité, anxiété, insomnie, tremor, sudations, hypertonie musculaire, hyperthermie, tachycardie<br>→ delirium tremens, convulsions   |
| <b>Hypnosédatifs</b>                                    | Anxiété, nervosité, insomnie, intolérance au bruit, hypertonie musculaire<br>→ convulsions, delirium                                   |
| <b>Tabac</b>                                            | Nervosité, troubles de la concentration, bradycardie, constipation, prise de poids, aggravation transitoire d'une bronchite chronique  |
| <b>Café</b>                                             | Fatigue, apathie, troubles de la concentration, céphalées                                                                              |
| <b>Antidépresseurs</b>                                  | Malaise diffus, état pseudogrippal, fléchissement de l'humeur                                                                          |
| <b>Antiépileptiques</b>                                 | Rebond de crises comitiales                                                                                                            |
| <b>Antimigraineux</b>                                   | Rebond de céphalées, état de mal migraineux                                                                                            |
| <b>Clonidine, méthylidopa</b>                           | Crise hypertensive de rebond, excitation                                                                                               |
| <b>Bêta-bloquants</b>                                   | Angor, palpitations, infarctus myocardique                                                                                             |
| <b>Corticostéroïdes</b>                                 | Malaise, nausées, vomissements, choc, sensibilité aux infections                                                                       |
| <b>Hormones thyroïdiennes</b>                           | Fatigue, apathie, frilosité                                                                                                            |
| <b>Laxatifs stimulants</b><br>(senné, bisacodyl)        | Constipation opiniâtre, occlusion intestinale                                                                                          |
| <b>Gouttes nasales</b><br>(phényléphrine et apparentés) | Rhinite aqueuse de type vasomotrice                                                                                                    |

Figure 18 : Substances dont l'interruption déclenche des symptômes de sevrage <sup>(S2)</sup>.

Le principe du test de sevrage est de créer une addiction puis de visualiser les signes cliniques et comportementaux liés à l'arrêt du traitement.

Chez l'animal, le syndrome de sevrage ne peut pas être quantifié en un seul et unique test, mais passe par l'évaluation de plusieurs caractéristiques de l'animal :

- l'anxiété : labyrinthe en croix surélevé (elevated plus maze) <sup>(1, 194, 203)</sup>,
- la réactivité sensori-motrice : réflexe de sursaut acoustique (acoustic startle reflex) <sup>(104, 194)</sup>,
- l'activité locomotrice et comportement général: arène ouverte (open field) <sup>(158, 181, 182, 187)</sup>,
- le seuil de crise (ou audiogenic seizure) <sup>(24)</sup>,
- les symptômes de sevrage spécifiques.

## b. L'évaluation du syndrome de sevrage

- Chez l'homme,

Plusieurs systèmes sont impliqués dans le syndrome de sevrage (tableau 3). De très nombreuses substances (médicaments et autres) peuvent en être responsable. Comme cité plus haut, l'inconfort produit par homéostasie ou par contraste se traduit différemment selon la substance. Le mécanisme d'action de la substance joue un rôle prépondérant dans les caractéristiques du syndrome de sevrage. Par exemple, le sevrage aux substances stimulantes (amphétamines, café) se traduira par des signes cliniques tels que l'apathie, l'anhédonie ou des difficultés de concentration.

Tableau 3 : Systèmes impliqués dans le syndrome de sevrage et signes cliniques associés chez l'homme.

| Psychique            | Digestif             | Algique                         | Neurovégétatif                         |
|----------------------|----------------------|---------------------------------|----------------------------------------|
|                      |                      | Douleurs musculaires/"osseuses" | Rhinorrhée                             |
| Insomnie             | Nausées/Vomissements | Autres douleurs viscérales      | Dacryorrhée                            |
| Angoisse             | Constipation         |                                 | Frissons                               |
| Signes dépressifs    | Diarrhée             |                                 | Sueurs                                 |
| Agitation/excitation | Crampes d'estomac    |                                 | Chaud et froid                         |
| Envie de drogue      | Anorexie             |                                 | Bâillements                            |
| Fatigue/Faiblesse    |                      |                                 | Piloérection                           |
|                      |                      |                                 | Tremblements                           |
|                      |                      |                                 | Mydriase                               |
|                      |                      |                                 | Céphalées                              |
|                      |                      |                                 | Altération de la sensibilité           |
|                      |                      |                                 | Bouffées de chaleurs ou sueurs froides |
|                      |                      |                                 | Modification de la tension artérielle  |
|                      |                      |                                 | Mydriase                               |
|                      |                      |                                 | Transpiration                          |

Chez l'homme, des échelles permettant l'évaluation quantitative des symptômes de sevrage ont été définies, et notamment pour le sevrage aux opiacés. L'échelle objective de sevrage aux opiacés (Objective Opioid Withdrawal Scale) permet de quantifier le sevrage en caractérisant les signes cliniques observés. Cette échelle permet une mesure objective de la sévérité des symptômes cliniques du sevrage aux opiacés.

Pour chaque signe clinique proposé, l'examineur comptabilise un score de 0 ou 1, pour l'absence ou la présence (Bâillement, rhinorrhée, piloérection, transpiration, larmoiement, tremblements des mains, mydriase, bouffées de chaleur ou de froid, vomissement, crampes abdominales, anxiété, agitation, convulsions musculaires).

L'échelle subjective de sevrage aux opiacés (Subjective Opioid Withdrawal Scale) adopte le même principe. Le patient attribue un score entre 0-4 selon les phrases proposées et qui caractérisent son état.

- *Chez l'animal*

Dans les cas de l'expérimentation animale, l'expérimentateur doit quantifier les signes cliniques. Les signes de sevrage qui apparaissent après exposition chronique à un opioïde peuvent être regroupés en trois groupes, selon le système affecté (77, 103, 148, 178) : autonome, somatomoteur, et comportemental (tableau 4).

Tableau 4 : Les systèmes impliqués dans le syndrome de sevrage et les signes cliniques associés chez l'animal

| Autonome                                   | Somatomoteur                                                                                                            | Comportementaux                                |
|--------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Variation de la tension artérielle         | Nociception                                                                                                             | Irritabilité (au toucher ou à la manipulation) |
| Diarrhée                                   | Réflexes neuromusculaires divers (mouvements involontaires de la patte postérieure, mouvement de la tête...)            | Altération du comportement de « manger/boire » |
| Variation de la fréquence respiratoire     | « Straub tail » qui correspond à une queue verticale ou quasi verticale et qui caractérise une imprégnation morphinique | Altération du sommeil                          |
| Variation du diamètre pupillaire           | Crises, convulsions                                                                                                     | Degré d'alerte                                 |
| Variation de la température corporelle     | Mastication/léchage                                                                                                     |                                                |
| Allodynie                                  |                                                                                                                         |                                                |
| Piloerection                               |                                                                                                                         |                                                |
| Ptôsis                                     |                                                                                                                         |                                                |
| Perte de poids                             |                                                                                                                         |                                                |
| Frissons « tremblements de chien mouillé » |                                                                                                                         |                                                |
| Claquement de dents                        |                                                                                                                         |                                                |

Les procédures quantifiant les effets de sevrage aux opioïdes impliquent l'enregistrement des signes autonomes, du seuil de crise, des réflexes, du poids corporel, et de l'activité électroencéphalographique.



- Échelles de score (figure 19)

Des échelles de score telle que celle de Gellert et Holtzman <sup>(77, 148)</sup> sont utilisées pour quantifier la réponse de l'animal et pour pouvoir comparer les effets des substances (tableau 5).

Une autre échelle, l'etho-score d'Espejo <sup>(71, 72)</sup>, permet également d'obtenir un score de sevrage global mais est uniquement basée sur la fréquence de mastication et la perte de poids.

$$\text{Etho-score} = (\text{MF}/10) + \text{WL}$$

MF: fréquence de mastication; WL: perte de poids

La fréquence de mastication est un paramètre basé sur le comportement, auquel est attribué un facteur 1/10 pour obtenir des valeurs comparables (chaque mastication est quantifiée par la valeur 1). Le second paramètre est un paramètre physique, évaluée avant traitement et 1 heure après le test (chaque perte de 1% est quantifiée par la valeur 1) <sup>(71, 72)</sup>.

Chez les rats, le poids corporel chute brutalement après interruption du traitement ou après précipitation. Cette chute peut atteindre 10% du poids initial. Les changements maximaux sont notés 48 heures (selon la demi-vie) après arrêt du traitement.

| Signe                                        | Nombre | Facteur de pondération                   |
|----------------------------------------------|--------|------------------------------------------|
| Perte de poids en 2 h                        | 30     | 1 (par 1% par rapport aux rats contrôle) |
| Nombre de tentative de fuite                 | 2-4    | 1                                        |
|                                              | 5-9    | 2                                        |
|                                              | >10    | 3                                        |
| Nombre de constriction abdominale            |        | 2 (par constriction)                     |
| Nombre de tremblement de chien mouillé       | 1-2    | 2                                        |
|                                              | >3     | 4                                        |
| Diarrhée                                     |        | 2                                        |
| Fasciculation faciale ou claquement de dents |        | 2                                        |
| Mouvements de déglutition                    |        | 2                                        |
| Hypersialorhée                               |        | 7                                        |
| Chromodacryorhée                             |        | 5                                        |
| Ptôsis                                       |        | 2                                        |
| Posture anormale                             |        | 3                                        |
| Érection ou éjaculation                      |        | 3                                        |
| Irritabilité                                 |        | 3                                        |

Tableau 5 : Échelle de score de Gellert et Holtzman <sup>(77)</sup>.

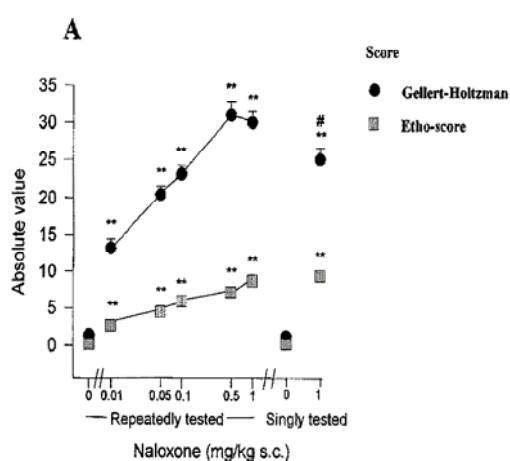


Figure 19 : comparaison des deux échelles de score du syndrome de sevrage chez l'animal <sup>(71)</sup>.

### c. Réalisation du test

Comme nous l'avons vu, chez l'animal sont évalués plusieurs paramètres qui permettent l'analyse du syndrome de sevrage (anxiété, réactivité sensori-motrice, activité locomotrice, seuil de crise, symptômes de sevrage spécifiques).

Pour chacun de ces tests, deux techniques peuvent être employées :

- Directe ou primaire

La substance est administrée de façon chronique à des animaux naïfs. La dose est généralement faible, et quand la tolérance se développe, les doses peuvent être augmentées. L'administration de la drogue est alors brutalement stoppée et les animaux sont observés (signes physiques et symptômes de sevrage).

Le sevrage peut être précipité par l'administration d'un antagoniste spécifique et il n'est alors pas nécessaire d'attendre 12–24 heures l'apparition de signes cliniques (voir tableau 6) <sup>(51, 97, S18)</sup>. En général, le syndrome précipité est plus aigu, plus marqué et plus intense que le syndrome non précipité.

Tableau 6 : Exemples de substances de référence connues pour leur potentiel addictif et les antidotes utilisés en expérimentation pour la révélation des symptômes de sevrage.

| Substance de référence | Antidote              |
|------------------------|-----------------------|
| Benzodiazépine         | Flumazenil            |
| Opioides               | Naloxone / Naltrexone |
| Nicotine               | Mecamylamine          |
| Cannabinoïdes          | SR141716A             |

- Substitution

Cette technique consiste en l'administration chronique d'un opiacé selon un protocole connu pour entraîner une addiction. Lorsque l'addiction est créée, le traitement est remplacé par la substance à tester. S'il s'agit d'un agoniste, les symptômes de sevrage disparaîtront ou s'atténueront et son potentiel de dépendance sera évalué par rapport à la dose efficace. S'il s'agit d'un antagoniste, les symptômes de sevrage sont amplifiés.

Une variante de cette technique consiste à ré-administrer une dose de drogue pendant les effets de sevrage afin de déterminer si ces signes sont réversibles ou atténués.

### d. Le test de sevrage aux opiacés précipité par la naloxone

Le saut des souris est caractéristique de la précipitation du sevrage des opiacés par la naloxone <sup>(3, 42, 52, 161, 184, 187)</sup>.

- Chez le rongeur, il existe deux protocoles permettant d'induire la dépendance aux opiacés <sup>(74)</sup> (tableau 7) :

- o L'injection de morphine (par voie intrapéritonéale) deux fois par jour pendant 14 jours maximum, en utilisant des doses croissantes (de 5 à 240 mg/kg) ou injection d'héroïne (2 à 18 mg/kg). L'état de manque est créé dès l'interruption du traitement.

- o L'implantation sous-cutanée de pastilles (une ou deux) de morphine 75 mg à libération lente. La libération de morphine reste constante au cours des deux semaines qui suivent l'implantation et la dépendance est obtenue dès les 24 heures suivant l'implantation. Ce protocole d'induction de la dépendance est donc la méthode de choix pour les études de conditionnement des effets aversifs du sevrage, qui nécessitent de pouvoir contrôler la contingence temporelle entre syndrome de sevrage et présentation des stimuli environnementaux.

Tableau 7: exemples de traitement induisant une dépendance

| Substance   | Voie                      | Dose             | Durée de traitement |
|-------------|---------------------------|------------------|---------------------|
| Morphine    | orale                     | 30mg/kg          | 9j                  |
| Diazepam    | intrapéritoneale          | 20 mg/kg         | 4j                  |
| Morphine    | intrapéritoneale          | 5-240mg/kg (2/j) | 14j                 |
| Héroïne     | intrapéritoneale          | 2-18mg/kg        | -                   |
| Morphine LP | implantation sous-cutanée | 75mg             | -                   |

- La précipitation du sevrage peut être réalisée par injection sous-cutanée d'un antagoniste des récepteurs  $\mu$  (naloxone par exemple). Les réponses des animaux sont variables selon la nature et les doses d'antagonistes sélectionnés (figure 20). Celle-ci se réalise à partir de 30 minutes après l'administration de morphine <sup>(3, 97)</sup>.

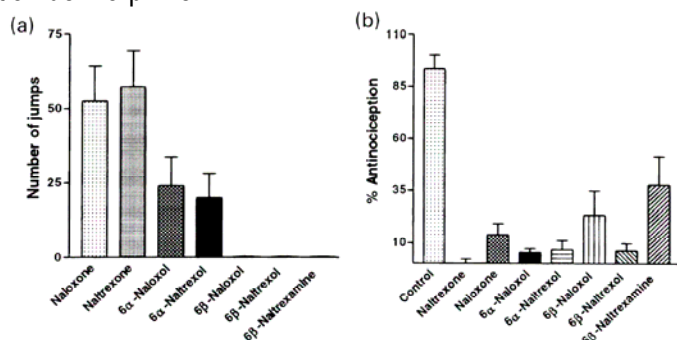


Figure 20 : Comparaison des effets de différents antagonistes (10 mg/kg i.p.) sur le saut précipité (à gauche) et sur l'antinociception induite (à droite) chez des souris prétraitée à la morphine <sup>(186)</sup>.

- Paramètres mesurés

Le nombre moyen de sauts par souris, la hauteur relative de chaque saut et l'incidence des sauts sont utilisés pour quantifier le comportement de sevrage. Le saut induit par l'administration de l'antagoniste peut être utilisé comme un paramètre sensible et précise de la dépendance physique (figure 21). Un index est alors calculé (DE50) et correspond à la dose de naloxone induisant une augmentation ou une réduction de 50% de l'effet observé (figure 22).

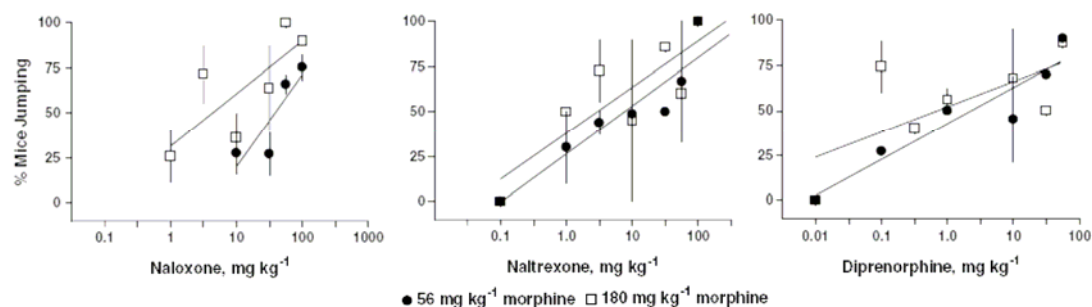


Figure 21 : Pourcentage de souris prétraitées 4 heures avec 56 ou 180 mg/kg de morphine présentant de sauts précipités par l'antagoniste (naloxone, naltrexone ou diprenorphine) en fonction des doses d'antagoniste. Chaque point représente 1 à 3 expériences correspondant à 7-11 souris chacune. Une augmentation du pourcentage de souris présentant un saut précipité est observée après traitement par des doses croissantes d'antagoniste <sup>(184)</sup>.

| Antagonist    | Morphine pretreatment<br>(mg kg <sup>-1</sup> ) | ED <sub>50</sub> values<br>(mg kg <sup>-1</sup> ) (95% CL) |
|---------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| Naloxone      | 56                                              | 38 (13–100)                                                |
|               | 100                                             | 25 (4.2–150)                                               |
|               | 180                                             | 4.3 (2.3–66)                                               |
| Naltrexone    | 56                                              | 7.6 (2.5–25)                                               |
|               | 180                                             | 2.1 (0.094–9.1)                                            |
| Diprenorphine | 56                                              | 2.3 (0.43–15)                                              |
|               | 180                                             | 0.70 (0.033–520)                                           |
| Nalorphine    | 56                                              | NA <sup>a</sup>                                            |
|               | 180                                             | 26 (13–99)                                                 |
| Naloxonazine  | 56                                              | NA <sup>a</sup>                                            |
|               | 180                                             | 50 (11–5100)                                               |

<sup>a</sup>Maximum % of mice jumping was less than 50%.

Figure 22 : valeurs de ED<sub>50</sub> pour des antagonistes opioïdes lors du saut précipité chez la souris après 4 heures de prétraitement à la morphine (doses de 56, 100 ou 180 mg/kg) <sup>(184)</sup>.

#### *e. Avantages*

- Le modèle animal est proche du modèle humain, les signes de sevrage sont proches et font intervenir les mêmes systèmes. Ce modèle permet donc de mimer en conditions réelles l'état de sevrage chez l'homme.
- La technique très peu onéreuse, puisqu'elle ne nécessite pas de matériel spécifique. Elle se base sur l'observation, l'enregistrement et l'analyse des comportements des animaux.
- La comparaison inter-laboratoire est plus aisée qu'avec des tests dérivant du conditionnement car les paramètres du syndrome de sevrage précipité sont moins complexes et plus facilement reproductibles d'un laboratoire à l'autre.
- Il permet de comparer l'action antagoniste des substances <sup>(97)</sup>.

#### *f. Inconvénients des techniques de détermination des symptômes de sevrage*

- Faux positifs : Les drogues donnant le plus d'effet au sevrage ne sont pas les plus « dures ».
- Faux négatifs : Les rats s'administrent l'hydromorphone à des doses ne donnant aucune effet de sevrage (pas de détresse produite par la naloxone). L'auto-injection intracérébrale de morphine ne donne pas d'état de manque. Il existe des médicaments qui suscitent un état de manque mais ne sont pas auto-administrés (antidépresseurs tricycliques tels que l'imipramine).
- De plus, le traitement symptomatique de l'état de manque n'empêche pas la reprise de drogue.
- La rechute survient en dehors de tout état de manque.
- L'évaluation est dépendante de l'observateur et malgré l'évaluation des symptômes selon des échelles standardisées, certains comportements sont sujets à interprétation.

## II.3 Discussion

L'approche séquentielle proposée par le CHMP (figure 1) correspond aux différentes problématiques soulevées par les substances à potentiel addictif. Selon le CHMP, les caractéristiques de la substance, son profil pharmacologique *in vitro*, puis les tests comportementaux sont consécutivement réalisés (7, 49).

Les caractéristiques d'une substance potentiellement capable d'un abus sont :

- Une action sur le système nerveux central,
- Des paramètres pharmacocinétiques spécifiques (courte durée d'action, biodisponibilité élevée),
- Une marge thérapeutique élevée,
- Une instauration d'une tolérance après traitement prolongé,
- Des similarités à d'autres substances induisant des abus,
- Des propriétés de renforcement.

L'approche proposée par le CHMP est composée de plusieurs étapes :

Tout d'abord, les études *in situ* (tests de microdialyse, de récompense après stimulation cérébrale et l'évaluation du comportement général) sont réalisées lorsque la substance est suspectée de présenter un potentiel addictif.

Ensuite sont réalisés les tests comportementaux et spécifiques décrits plus haut (préférence de place conditionnée, auto-administration, discrimination).

Le modèle, ainsi que la voie d'administration sont choisis au cas par cas ; ceux-ci dépendent en effet de la substance et/ou de sa classe pharmacologique ; de la même façon, le choix de l'espèce est soumis à de nombreux facteurs. L'espèce sélectionnée doit bien sur être sensible et documentée.

Ces études comportementales spécifiques présentent des particularités (7, 27):

- Il est nécessaire d'obtenir une courbe dose/réponse,
- La pharmacocinétique du produit et de ses métabolites présentent une grande importance,
- Les concentrations de test dépassent très souvent largement les concentrations thérapeutiques, afin de simuler une administration massive de substance,
- Les tests doivent être réalisés en présence de contrôles positifs et négatifs, pour leur validation scientifique,
- Les évaluations et observations sont multiples et se réalisent avant, pendant et après le traitement.

En cas de nouveau mécanisme d'action, les études discrimination sont généralement les premières entreprises car ces études permettent d'identifier les similarités d'action avec une classe pharmacologique connue (7, 27). Elles peuvent être utilisées pour la classification et la caractérisation des substances addictives, y compris des hallucinogènes. C'est une technique à très bonne prédictibilité sur l'homme (45, 65, 107, 164) car elle est basée sur les signaux associés à la prise de drogue.

Les études de discrimination peuvent être réalisées sur toutes les substances agissant sur le système nerveux central, y compris celles à faible pouvoir addictif. De plus elles permettent le criblage des nouvelles substances thérapeutiques pour leurs effets similaires à certains traitements ou pour leur

absence d'effet addictif. En revanche, elles ne permettent qu'une évaluation indirecte du potentiel de dépendance, par rapprochement, analogie et comparaison des effets.

Pour les nouvelles substances appartenant aux classes au potentiel de dépendance connu et défini (par exemple : opioïdes, stimulant du SNC), les études de discrimination ne seront pas nécessaires. Un nouvel opioïde devra subir les tests de sevrage et d'auto-administration uniquement. De la même façon, un nouveau stimulant du SNC devra subir le test d'auto-administration.

Pour les nouvelles substances appartenant aux classes au potentiel de dépendance moins clairement défini (par exemple : sédatifs, anxiolytiques), les études d'auto-administration et d'évaluation du syndrome de sevrage doivent être réalisées pour caractériser les effets de renforcement et de sevrage. Pour les nouvelles substances appartenant aux classes moins connues (antagonistes des récepteurs NMDA, cannabinoïdes), les études de discrimination peuvent être utiles pour les incorporer parmi les classes pharmacologiques existantes. De plus, des études d'auto-administration et d'évaluation du syndrome de sevrage doivent être réalisées pour caractériser les effets de renforcement et de sevrage. Pour les inhibiteurs de la recapture de monoamines (ISRS, INRS), moins bien étudiés, des tests supplémentaires doivent être menés pour caractériser les problèmes dus à l'arrêt du traitement.

Après une caractérisation des effets dans les études de discrimination, les propriétés de renforcement (auto-administration et/ou préférence de place) et les éventuels symptômes de sevrage d'une substance sont évalués <sup>(7, 27)</sup>. La technique d'auto-administration permet une mesure directe des effets de renforcement et reste très prédictive. La mise en œuvre de cette technique est complexe mais l'auto-administration reste la technique de référence pour l'évaluation des propriétés de renforcement d'une substance. Bien que moins sensible, la technique de préférence de place est cependant plus simple à réaliser.

L'auto-administration est la méthode la plus directe pour l'évaluation du potentiel de dépendance, plus particulièrement chez le primate chez qui le test est très sensible et extrapolable à l'homme <sup>(110, 123, 155)</sup>. De nombreuses approches et protocoles peuvent considérablement faire varier le résultat final, mais pour des raisons de biodisponibilité, la voie intraveineuse s'avère plus utilisée. Par ailleurs, la méthode de substitution (apprentissage de la réponse opérante avec une substance de référence puis test de la substance d'essai) est plus sensible que la méthode directe (apprentissage de la réponse opérante avec la substance d'essai). Les comportements d'auto-administration de l'animal avant substitution doivent être clairement définis, car les observations et l'enregistrement des effets ont lieu avant, pendant et après administration.

Après ce test, les animaux peuvent être réutilisés (particulièrement les primates).

Aucune mortalité inhérente à l'administration unique ou répétée d'une substance addictive n'est généralement observée car les doses sont sectionnées pour être faibles ou intermédiaires. Cependant, l'observation de mortalité est un signal d'alerte pour un réajustement des protocoles.

Les tests avec auto-administration de substance addictive utilisent généralement des protocoles en accès limité. Les animaux ont alors accès libre à la substance pendant un nombre d'heures fixé par l'expérimentateur (3 à 10 heures par jour). De cette façon, les effets délétères observés après administration chronique sont minimisés. Les protocoles en accès illimité sont plus rarement utilisés, car les animaux ont la possibilité de s'auto-administrer la substance 24 heures sur 24 et 7 jours sur 7. Des psychostimulants tels que la cocaïne induisent alors très rapidement une détérioration de la condition générale de l'animal et un haut taux de mortalité <sup>(30)</sup>. Les protocoles en accès illimité peuvent apporter des informations utiles car ils peuvent simuler chez l'animal un comportement de consommation retrouvé chez l'homme avec certaines substances (psychostimulants notamment).

En parallèle de l'évaluation des propriétés de renforcement d'une substance est évalué le syndrome de sevrage. En théorie, la tolérance devrait être évaluée avant le sevrage, car le protocole du test de sevrage dépend du résultat du test de tolérance. Dans le cas des opiacés, le test de tolérance est un test d'action pharmacologique (analgésie: test de la plaque chauffante). De la même façon, dans le cas des benzodiazépines, il peut s'agir de la mesure de l'effet anxiolytique. Cependant, la tolérance n'est pas un indicateur fiable de la dépendance. Le sevrage, en revanche, implique une dépendance physique.

Dans le test de sevrage, la voie d'administration sélectionnée est généralement la voie d'administration prévue pour les études cliniques. Le protocole implique l'instauration d'une dépendance. Il faut par conséquent s'assurer de l'occupation adéquate des récepteurs pour le développement d'une réponse neuro-adaptative.

Le test de sevrage précipité permet une mise en évidence plus rapide et plus sensible des signes cliniques associés à un syndrome de sevrage. Encore une fois, les évaluations sont multiples et se réalisent avant, pendant et après le traitement, avec des périodes d'observation suffisamment longues et des fréquences d'observation adaptées pour la visualisation et l'enregistrement des signes cliniques.

Les phénomènes tels que le sevrage non-physique ou émotionnel doivent être évalués par des tests spécifiques et adéquats : mesure de l'anxiété, de l'architecture du sommeil, de l'aversion de place conditionnée.

Chaque test permet une approche spécifique de la molécule testée. Les trois techniques de préférence de place, d'auto-administration et de discrimination sont complémentaires et chacune a des caractéristiques uniques permettant une approche différente. Ces techniques doivent par conséquent être utilisées parallèlement afin de cerner tous les aspects de la substance testée, et ce, particulièrement si le mécanisme d'action est nouveau ou inconnu. Des résultats positifs à ces tests devront nécessairement être analysés en tenant compte d'un environnement multi-factoriel. La galénique, la pharmacocinétique et les données cliniques disponibles doivent absolument être prises en compte pour l'extrapolation des résultats à l'homme.

Dans ces tests comportementaux, les observations et les traitements doivent être scrupuleusement synchronisées, de façon à observer l'effet sur l'animal au moment du pic d'exposition à la substance.

Le pic d'exposition ( $T_{max}/C_{max}$ ) à la substance doit se situer pendant le conditionnement de façon à créer une association maximale entre l'effet et l'environnement. Ce pic d'exposition dépend de la dose, de la voie d'administration, de l'état physiopathologique de l'animal. Il faut notamment prendre en compte les effets de tolérance induits par certaines substances et augmenter les doses pour créer une dépendance ou pour maintenir une concentration plasmatique à un niveau constant (figures 23 et 24).

Un suivi analytique de la substance peut éventuellement être réalisé sur des animaux satellites afin de confirmer que le pic sanguin survient effectivement pendant les phases de conditionnement.

Les caractéristiques pharmacocinétiques de la substance à tester sont donc extrêmement importantes pour un bon apprentissage de la réponse conditionnée.



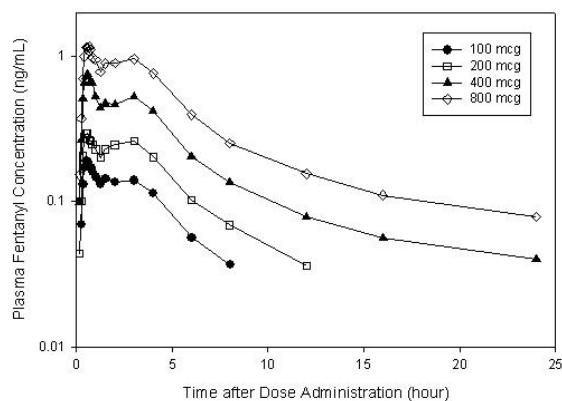


Figure 23 : La concentration plasmatique de fentanyl varie selon la dose administrée (S4).

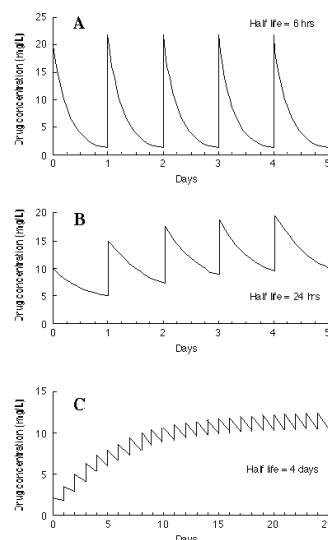


Figure 24 : Différents schémas d'administration d'une substance selon sa demi-vie (S8).

Les études sur les animaux présentent de nombreux avantages par rapport aux études sur les humains.

- Elles se révèlent relativement moins chères que chez l'homme, et permettent surtout de ne pas traiter des humains avec des substances potentiellement addictives et/ou toxiques,
- Elles se déroulent tôt dans le développement du produit, et les résultats des études peuvent influencer les stratégies de développement des substances,
- De très larges gammes de doses peuvent et doivent être testées,
- Différentes voies d'administration peuvent être comparées,
- Des comparaisons entre les substances sont plus aisées, car la variabilité des études précliniques est maîtrisée,
- Des études mécanistiques peuvent être entreprises.

Dans le cas de médicaments, l'aspect bénéfice/risque reste prédominant, sachant que le bénéfice médical doit être systématiquement contrebalancé par les mesures de contrôle liées à l'abus de la substance.

Le conditionnement occupe une place importante dans toutes ces techniques. Il permet l'apprentissage aux animaux d'une réponse quantifiable révélatrice des propriétés de la substance.

Les tests d'évaluation du potentiel de dépendance (tests de préférence de place, d'auto-administration, de discrimination et des symptômes de sevrage) possèdent des bibliographies très conséquentes. Ces tests sont donc bien documentés et sont utilisés en routine dans le développement préclinique des médicaments. Des protocoles standardisés existent, ce qui tend à faciliter l'interprétation et la comparaison inter-laboratoires.

Malgré la standardisation des tests, les paramètres spécifiques à chaque test sont nombreux et leur réalisation nécessite une grande précision. Les valeurs historiques restent, comme toujours dans l'expérimentation animale, les valeurs de référence.

De plus, les résultats de ces tests peuvent être soumis à l'interprétation de l'expérimentateur, pendant la génération des données ou pendant l'analyse des comportements de l'animal. Il convient par conséquent d'utiliser des règles standardisées et homogènes pour permettre une interprétation inter-laboratoire.



### **III LA MEMOIRE**

## III.1 Mécanismes de la mémoire

### III.1.1 Définition

La mémoire est un processus cognitif permettant d'apprendre et de se souvenir des apprentissages antérieurs <sup>(18)</sup>.

Cette notion regroupe donc deux processus différents : l'apprentissage et la mémorisation.

L'apprentissage est une modification relativement permanente du comportement qui marque un gain de connaissance, de compréhension ou de compétence grâce aux souvenirs mémorisés. La mémoire est le fruit de cet apprentissage, la trace concrète qui en est conservée dans nos réseaux de neurones <sup>(S5)</sup>.

Plusieurs types de mémoire peuvent être définis (figure 25)

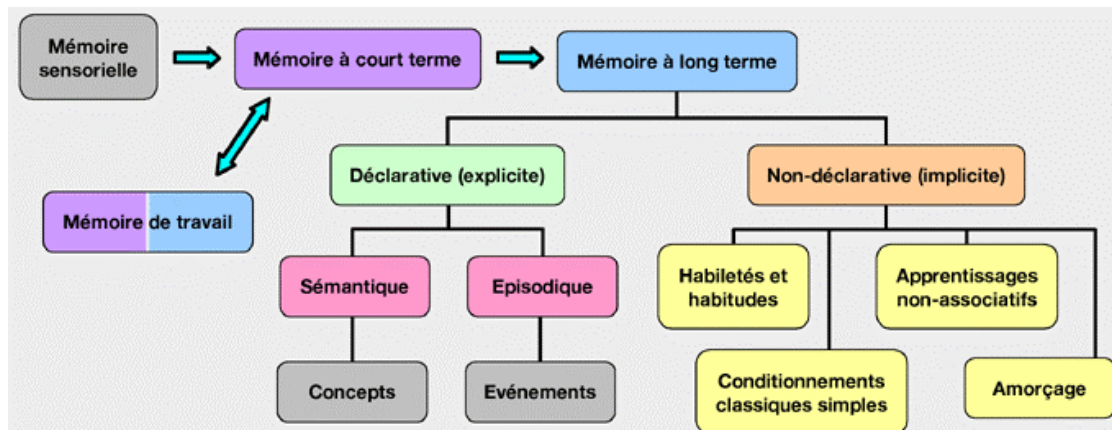


Figure 25 : différents types de mémoire <sup>(S17)</sup>.

- La mémoire sensorielle correspond à la mémoire automatique, issue de nos capacités perceptives, s'évanouissant généralement en moins d'une seconde.
- La mémoire court terme permet de garder en mémoire une information pendant moins d'une minute environ et de pouvoir la restituer pendant ce délai. Elle est typiquement utilisée dans une tâche qui consiste à restituer, dans l'ordre, une série d'éléments qui viennent d'être énoncés.
- La mémoire long terme comprend la mémoire des faits récents, où les souvenirs sont encore fragiles, et la mémoire des faits anciens, où les souvenirs ont été consolidés. Elle peut être schématisée comme la succession dans le temps de trois grands processus de base : l'encodage, le stockage et la restitution (ou récupération) des informations. La mémoire à long terme peut être séparée en mémoire explicite ou déclarative (savoir), et en mémoire implicite (savoir-faire) <sup>(S5)</sup>.

### III.1.2 Mécanismes cérébraux

La mémoire utilise de très nombreuses régions de notre cerveau, d'où des déficits de mémoire variables d'une maladie à l'autre (S3, S5, S9, S12).

Le diencephale (thalamus et hypothalamus) jouerait un rôle important dans les processus de mémoire procédurale alors que le système limbique (hippocampe, noyau amygdalien, région septale, gyrus cingulaire, circonvolution parahippocampique) serait quant à lui impliqué dans la mémoire déclarative. Le système limbique confère un pouvoir affectif à une information sensorielle. L'hippocampe, les lobes temporaux, de même que les structures du système limbique qui leur sont reliées, sont essentiels à la consolidation de la mémoire à long terme (figure 26).

Le circuit de Papez (ou circuit hippocampo-mamillo-thalamique) est un sous-ensemble de connexions qui relient les structures limbiques entre elles (figure 27).

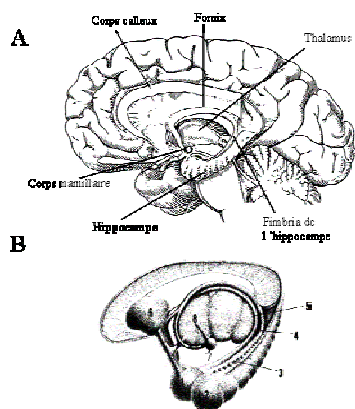
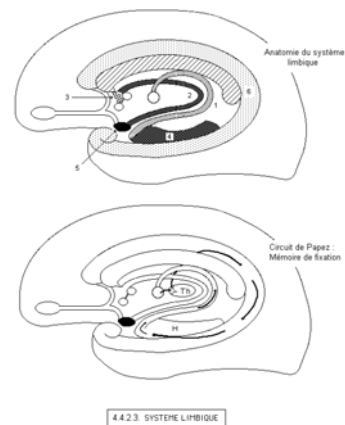


Figure 1. A : Hippocampe lésé après ablation de l'hémisphère gauche  
B : Le système limbique : 1. Amygdale 2. Hippocampe 3. Fimbria  
4. Fornix 5. Strie médullaire 6. Septum 7. Corps mammillaire 8. Thalamus

Figure 26 : localisation et structure du système limbique.



4.4.2.3. Système limbique  
1. Fornix 2. Bandelette semi-circulaire 3. Aire septale 4. Hippocampe 5. Noyau amygdalien  
6. grand lobe limbique de Broca (gyrus cingulaire + gyrus para-hippocampique)  
Ht. hippocampe Th. Thalamus

Figure 27 : Système limbique et circuit de Papez.

L'information transite successivement de l'hippocampe aux corps mammillaires de l'hypothalamus, au noyau antérieur du thalamus, au cortex cingulaire, au cortex entorhinal pour revenir finalement à l'hippocampe.

Après avoir circulé un certain nombre de fois dans le circuit de Papez, les associations temporaires d'assemblées de neurones générées par un événement particulier vont subir un remodelage physique qui va les consolider.

Au bout d'un certain temps, ces associations se stabiliseront et deviendront indépendantes de l'hippocampe. Une lésion hippocampale empêchera alors la formation de nouveaux souvenirs mais n'effacera pas ceux encodés avant la lésion (40, 130, 204).

Le système limbique se désengage alors progressivement et les souvenirs n'y transitent plus mais se retrouvent encodés dans des zones spécifiques du cortex qui correspondent aux régions où les informations sensorielles qui sont à l'origine des souvenirs ont été reçues (le cortex occipital pour les souvenirs visuels, temporelle pour les souvenirs auditifs, etc).

### III.1.3 Mécanismes moléculaires

- **Système cholinergique** (S3, S5, S9, S12)

Depuis longtemps le système cholinergique est connu pour son implication dans les processus mnésiques, *via* les récepteurs nicotiniques et muscariniques. Des substances qui augmentent, miment ou inhibent la dégradation de l'acétylcholine (ACh) augmentent l'apprentissage et la mémorisation. Au contraire, les substances qui diminuent l'ACh diminuent la performance cognitive (dans certains dysfonctionnements mnésiques comme la maladie d'Alzheimer, on note une diminution de l'activité de l'ACh). Dans ce processus de mémoire, les synapses cholinergiques créent un potentiel d'action haute fréquence et de courte durée, activant les synapses glutamatergiques, qui déclenchent le phénomène de potentialisation long terme. L'ACh augmente l'activité de nombreux neurones corticaux, causant la suppression des courants membranaires potassiques et entraînant ainsi la dépolarisation et la suppression à l'adaptation <sup>(196)</sup>. L'administration de scopolamine (antagoniste des récepteurs muscariniques) est couramment utilisée en expérimentation animale pour l'induction d'amnésies antérogrades.

- **Système glutamatergique** (S3, S5, S9, S12)

Le glutamate est le principal neurotransmetteur exciteur du système nerveux central. Il agit sur deux types de récepteurs : les récepteurs ionotropiques (couplés à un canal ionique) et les récepteurs métabotropiques (couplés à une protéine G effectrice). Les récepteurs ionotropiques sont désignés selon le nom de leur agoniste principal : récepteurs NMDA (activés par le N-méthyl-D-aspartate), AMPA (activés par le  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionate), kaïnate.

Les deux principaux sont les récepteurs AMPA et NMDA.

Les antagonistes des récepteurs NMDA sont connus pour leurs effets amnésiants : dizocipline, PCP (phencyclidine) <sup>(145)</sup>.

- **La potentialisation à long terme (PLT ou Long-Term Potentialisation)**

La potentialisation à long terme correspond à une augmentation d'amplitude de la réponse post-synaptique à la suite d'une intense activation pré-synaptique, ce qui est le propre d'une réaction de mémorisation (S3, S5, S9).

Elle se traduit biochimiquement par une cascade de réactions enzymatiques, qui a pour point de départ la dépolarisation des récepteurs NMDA et à l'évacuation des ions  $Mg^{2+}$ . Un grand nombre d'acteurs interviennent dans cette cascade, tels que la  $Ca^{2+}$ /calmoduline, l'adénylate cyclase, la protéine kinase II calmoduline dépendante, l'adénosine monophosphate cyclique et la protéine kinase A.

### III.1.4 Les tests d'évaluation des fonctions cognitives

Les rongeurs font preuve de grandes capacités mnésiques car ils doivent apprendre et se souvenir de l'environnement spatial afin de survivre dans la nature.

Beaucoup de tests mnésiques consistent en l'apprentissage d'un environnement spatial, comme par exemple le test du labyrinthe aquatique et du labyrinthe radial. Le labyrinthe aquatique, initialement décrit au début des années 80, est maintenant le test comportemental le plus utilisé en neurosciences <sup>(55)</sup>. Le labyrinthe radial à 8 bras, développé pour les rats par Olton et Samuelson <sup>(135)</sup> est aussi très utilisé.

De très nombreux autres tests réussissent à identifier l'apprentissage d'un environnement spatial : le labyrinthe en T <sup>(54)</sup>, le labyrinthe de Barnes <sup>(14)</sup>, ainsi que l'apprentissage non spatial : test de conditionnement à la peur <sup>(4)</sup>, les expériences d'évitement <sup>(144)</sup>.

Tous ces tests reposent sur plusieurs principes fondamentaux : les labyrinthes, le conditionnement ou l'appariement à un modèle (figure 28).

Il faut savoir qu'« aucune méthode ne mesure l'apprentissage ou la mémoire ; On mesure la performance puis on fait inférence. D'autres facteurs influent sur cette performance, comme l'attention, la motivation, l'état émotionnel ou les conditions externes. » <sup>(5)</sup>.

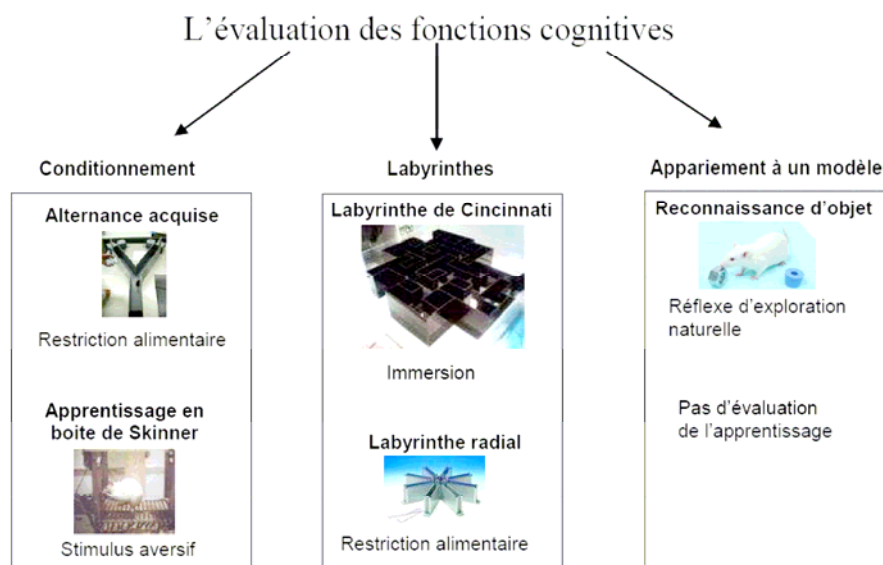


Figure 28 : schéma des différents principes des tests d'évaluation des fonctions cognitives

## III.2 Labyrinthes

### III.2.1 Généralités

Les labyrinthes constituent une méthode largement répandue pour évaluer les capacités de mémorisation et de gestion de l'information spatiale. Le rat part d'un point de départ et doit trouver la sortie (plate-forme d'échappement ou récompense) (figure 29).

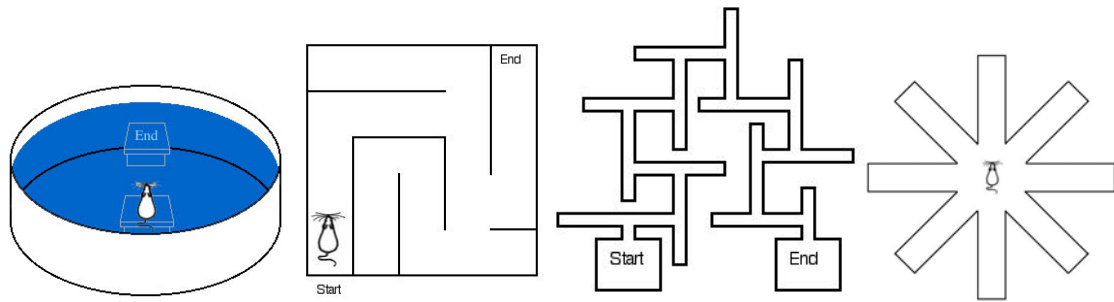


Figure 29 : Schémas de différents labyrinthes (de gauche à droite : Morris, classique, multiple T, radial à 8 branches)

La motivation peut donc être appétitive (nourriture placée de manière visible dans le labyrinthe) ; le rat doit alors élaborer une stratégie optimale pour explorer l'environnement (labyrinthe radial à 8 branches par exemple). Elle peut être aversive dans le cas des tests aquatiques (labyrinthe de Morris, de Cincinnati) : l'animal doit trouver la plate-forme d'échappement pour fuir la noyade.

Les labyrinthes sont des tests qui permettent l'évaluation de la mémoire court terme ainsi que de l'apprentissage.

### III.2.2 Labyrinthe aquatique de Morris

#### a. Principe

Le labyrinthe aquatique est l'un des tests les plus couramment utilisés pour mesurer l'apprentissage la mémoire. Ce test est notamment affecté par l'âge, la souche de l'animal, le protocole utilisé, la prédisposition au stress et les changements hormonaux, mais il permet l'évaluation d'une amnésie et / ou d'un déficit d'apprentissage produit par une substance ou une modification cérébrale.

Le labyrinthe aquatique de Morris a été conçu par Richard Morris au début des années 1980 <sup>(126)</sup>. Les rats sont d'excellents nageurs et ils doivent retrouver une plate-forme d'échappement (figure 30).



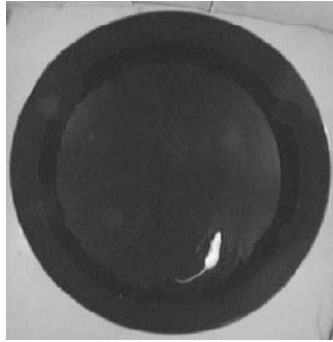


Figure 30 : Photographie d'une piscine de Morris

#### *b. Réalisation du test (21, 55, 93, 85, 126, 159, 183)*

Le test se réalise généralement dans une enceinte circulaire d'environ 2 m de diamètre et 60 cm de hauteur remplie à moitié. Une plate-forme d'échappement transparente est localisée sous la surface de l'eau et les rats ne peuvent donc pas la localiser visuellement pendant le test. Des signaux visuels bien distincts sont placés sur les murs de la pièce, permettant ainsi à l'animal de se situer dans l'espace.

Avant de laisser les rats dans la piscine, ils sont placés 30 s sur la plate-forme. De cette façon, ils apprennent qu'il existe une sortie et se repèrent dans l'espace.

Le rat est ensuite placé au point de départ et le temps passé à rejoindre la plate-forme d'échappement est enregistré. S'il ne trouve pas la plate-forme en 2-3 min, il est délicatement poussé vers celle-ci, sorti de la piscine et séché.

#### *c. Composants et paramètres*

- La plate-forme et l'eau <sup>(95, 183)</sup> : L'eau doit juste recouvrir la plate-forme, de façon à la sentir avec leurs pattes postérieures lorsqu'ils passent par-dessus (rat 5mm). La température de l'eau doit être assez élevée (24-26°C). Le froid encourage l'activité locomotrice mais cause l'hypothermie, qui altère l'apprentissage <sup>(93)</sup>. Un opacifiant (lait en poudre par exemple) peut être ajouté pour accentuer le contraste en l'environnement et le rat, ce qui permet une meilleure qualité du signal vidéo enregistré.
- Temps sur la plate-forme et « sauvetage » : Le temps sur la plate-forme doit être suffisant pour qu'ils apprennent sa localisation par rapport aux signaux visuels muraux. A la fin de chaque essai (échec ou réussite), les rats sont laissés sur la plate forme d'échappement pendant au moins 10 s avant d'être récupérés et séchés.
- Les signaux muraux correspondent à des raies noires de différentes largeurs (verticales, horizontales, triangles).
- Le test est réalisé sur quatre jours, avec quatre essais par jour. Les points de départ varient dans une même session et l'ordre des départs varie d'un jour à l'autre (N, S, E, O). Vingt à trente minutes entre chaque essai est nécessaire pour un repos minimal de l'animal.
- Les rats font spontanément le tour de la piscine de Morris. Ils peuvent avoir des techniques de recherche, en s'éloignant en cercles concentriques du bord de la piscine, par exemple.

- Le temps passé pour rejoindre la plate-forme et ceux passés dans chaque quadrant sont enregistrés (figure 31).

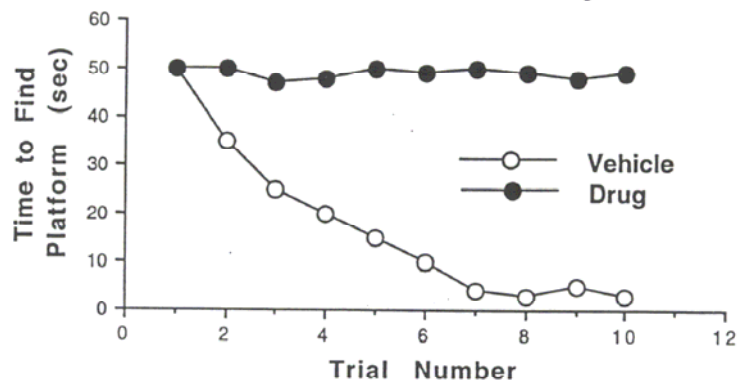


Figure 31 : temps pour trouver la plate-forme en fonction du nombre d'essais. Le rat traité au véhicule présente une nette amélioration des performances pour, après 7-8 essais, trouver la plate-forme d'échappement en quelques secondes seulement. En revanche, le rat traité à la substance amnésiante ne présente aucune amélioration des performances à ce test <sup>(S17)</sup>.

#### d. Avantages

- Le rat est très motivé. Il cherche sans attendre la plate-forme d'échappement.
- L'eau ne présente pas en elle-même d'indices visuels de localisation.
- Ce test permet l'évaluation des fonctions d'apprentissage et de mémoire spatiale.

#### e. Inconvénients

- La motivation aversive (risque de noyade) cause un stress chez les animaux. Les souris sont d'un tempérament plus anxieux que les rats. Ces derniers sont donc préférentiellement utilisés pour ce test.
- La récompense correspond au « sauvetage » de l'animal, l'expérimentateur doit donc se tenir hors du champ visuel de l'animal, pour ne pas perturber sa performance.

## III.3 Les techniques de conditionnement

### III.3.1 Généralités

Ces techniques dérivant du conditionnement présentent les mêmes caractéristiques que les techniques de préférence de place, d'auto-administration ou de discrimination. De très nombreux avantages, et des inconvénients. La mémoire est évaluée après apprentissage/conditionnement d'une réponse quantifiable.

#### *a. Alternance acquise en labyrinthe en T ou Y*

L'animal en restriction alimentaire est conditionné à alterner son choix lors d'essais successifs dans le labyrinthe en T. Sa capacité à mémoriser et à gérer l'information spatiale est évaluée après traitement (cette technique est plus détaillée plus loin).

#### *b. Analyse du temps d'immobilité (freezing time)*

Le test de peur conditionnée (temps d'immobilité) permet l'évaluation de l'apprentissage et est utilisé pour l'évaluation des altérations neuroanatomiques.

Face à un stimulus important, le rat a une réaction stéréotypée : il s'immobilise. Le rat est d'abord soumis à un choc électrique léger associé à un stimulus sonore, puis il n'est soumis qu'au stimulus. Le temps d'immobilité, défini comme le « temps pendant lequel le rat ne bouge pas (excepté les mouvements de respiration), correspond à une performance de la mémoire.

#### *c. Apprentissage en boîte de Skinner*

Skinner a élaboré cette technique de conditionnement qui découle de l'apprentissage par essai-erreur. Celle-ci consiste à conditionner l'animal à associer l'appui sur un levier et la distribution de nourriture (figure 32). L'animal oublie plus rapidement cette association après traitement par une substance amnésiante.

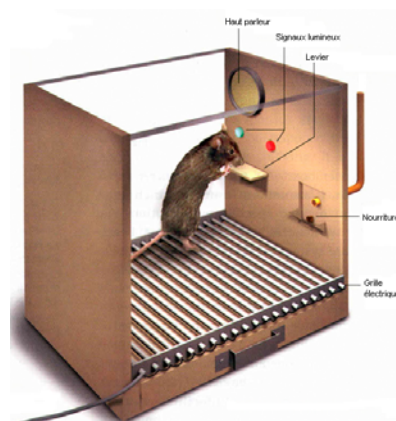


Figure 32 : Boîte de Skinner

#### *d. L'évitement passif*

L'évitement passif est un test simple et de screening permettant l'évaluation de la mémoire et est basé sur la tendance des animaux à se sentir plus en sécurité dans une zone fermée et sombre (figure 33). L'animal apprend à éviter un léger choc électrique dans les pattes à l'intérieur du compartiment sombre passant spontanément du compartiment sombre au compartiment éclairé. Le temps mis par l'animal pour entrer dans le compartiment sombre alors qu'il est dans le compartiment éclairé est mesuré (= latence d'entrée dans le compartiment sombre). Une augmentation de cette latence reflète la force du souvenir pour l'événement aversif.



Figure 33 : Cage d'évitement passif

### III.3.2 Exemple du test d'alternance acquise en labyrinthe en T

#### a. Principe du test

Le labyrinthe en Y est un test initial et rapide pour l'évaluation des fonctions cognitives générales <sup>(54)</sup>. Il est basé sur le principe de l'alternance spontanée et est sensible à l'administration de substances amnésiantes (figure 34). Son principal avantage est qu'il peut être réalisé sans introduction d'un stimulus aversif (restriction alimentaire ou hydrique, immersion).

Le rongeur est un animal qui explore spontanément son environnement et le rat est l'espèce préférée pour ce test d'évaluation des fonctions cognitives, mais d'autres espèces, moins courantes, peuvent aussi être utilisées, comme le homard par exemple <sup>(109)</sup>.

Placé lors du premier essai dans un labyrinthe en T, le rat a libre choix entre les deux bras du « T ». Lors du second essai, le rat choisira le bras non visité. Ce phénomène se nomme alternance spontanée. Une variante de cette technique est l'alternance renforcée (incluant une restriction alimentaire préalablement au test).

Ce test se réalise avec des souris ou des rats et fait appel à la mémoire de travail, c'est à dire que la réponse correcte varie selon celle qu'ils ont précédemment choisie.

Le test du labyrinthe en T évalue la capacité du rongeur à mémoriser son premier choix.

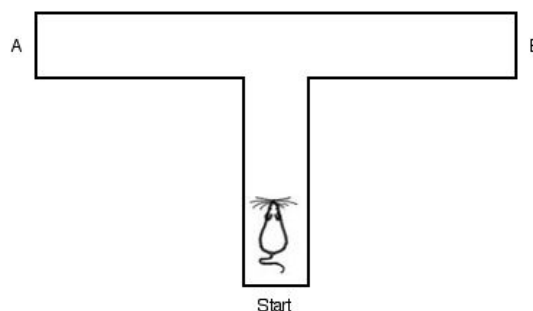


Figure 34 : Schéma du labyrinthe en T

#### b. Réalisation du test <sup>(34, 50, 59, 60, 79, 119)</sup>

- Dans le cas de l'alternance renforcée, une restriction alimentaire est nécessaire pour motiver l'animal. Les animaux doivent alors avoir un poids de 90-95% du poids sans rationnement.
- Habituation à l'appareil : Les animaux sont placés dans le labyrinthe pendant environ 3 min. De la nourriture est disponible aux extrémités des deux bras. Cette opération réalisée 4 fois avec des intervalles de temps minimum de 10 min permet à l'animal d'explorer le labyrinthe et de découvrir la localisation des récompenses.
- Entraînement : L'animal n'a ensuite accès qu'à un seul bras par essai (par simple blocage du bras opposé). Chaque bras disponible est alterné de façon équivalente. Ces entraînements ont pour but d'apprendre à l'animal à alterner son choix entre les deux bras du labyrinthe.
- Test :

- o Pour l'alternance renforcée, le choix de l'animal lors du premier essai est imposé. Lors du second essai, l'animal a accès aux deux bras et doit alors faire son choix. Une réponse correcte correspond à un choix alterné qui aboutit à la consommation de la récompense. Des sessions de 15-20 essais par jour peuvent être réalisées jusqu'à ce que l'animal soit totalement repu.
- o Pour l'alternance spontanée, l'animal est placé dès le premier essai devant son choix. Il est confiné dans le bras sélectionné pendant 30 s puis il est replacé au point de départ pour le deuxième essai. Une réponse correcte est un choix alterné entre les deux bras. Des sessions journalières de 10-15 essais par animal peuvent être réalisées pendant plusieurs jours consécutifs.
- o Le choix de l'animal est enregistré pour chacun de ses essais et son score est calculé. Un score de 0% correspond à aucune alternance ; un score de 100% correspond à l'alternance à chaque essai. Les animaux contrôle obtiennent généralement un minimum de 80 % de réponse correcte (figure 35).

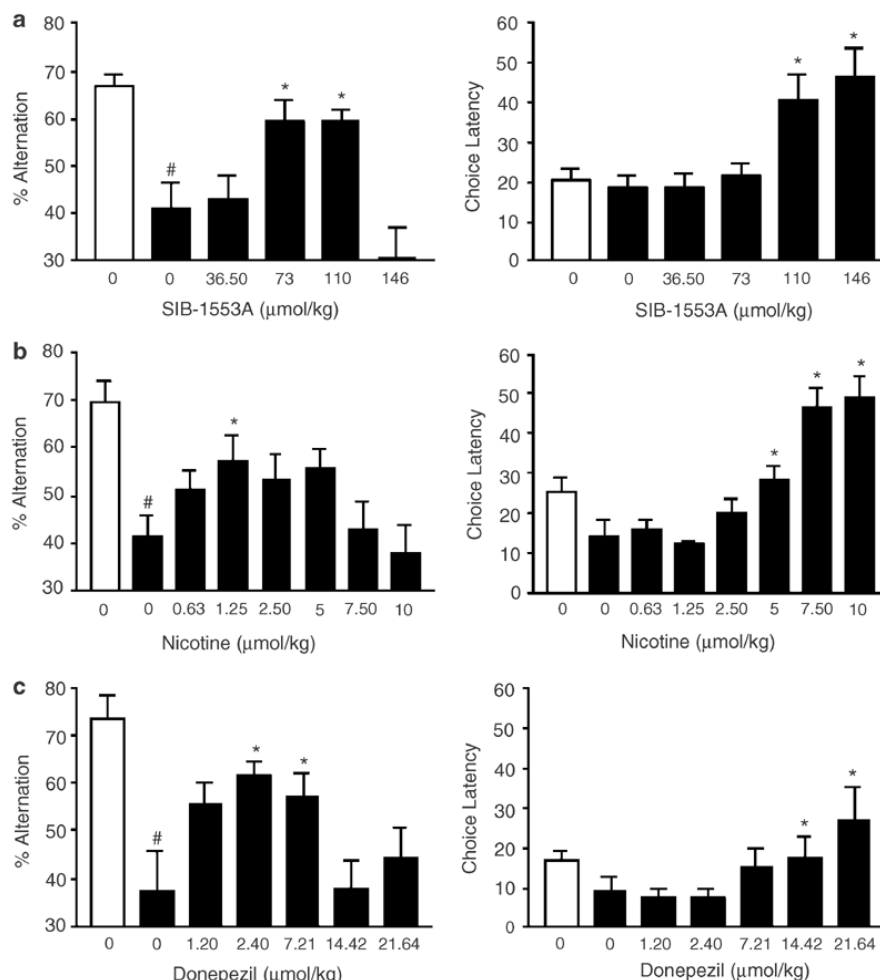


Figure 35 : Effets aigus de trois composés : SIB-1553A (a), nicotine (b) et donepezil (c) sur l'alternance spontanée chez les souris traitées à la scopolamine dans un labyrinthe en T. Les données sont présentées en pourcentage d'alternance (gauche) et en temps de latence avant le choix en secondes (droite) mesurée sur 8 essais. Les barres noires représentent les groupes traités à la scopolamine ; les barres blanches représentent les groupes traités au véhicule <sup>(26)</sup>.

### *c. Avantages (59, 60)*

- Rapidité du test. Chaque passage d'un animal ne dépasse pas 2 min, ce qui permet de réaliser le test en peu de temps. En cas d'échec de l'animal en 90 s, l'animal est re-testé plus tard.
- Le temps passé dans le labyrinthe permet une évaluation simultanée des effets sensori-moteurs d'un traitement.
- Le matériel présente une simplicité de construction et est très peu onéreux.
- La technique est simple d'utilisation et ne nécessite pas de compétences spécifiques. L'expérimentateur doit être vigilant pendant l'habituation et l'entraînement des animaux.
- Diverses variantes de ce test permettant d'augmenter la charge mnésique.
- Des approches agonistes-antagonistes peuvent être entreprises, pour évaluer les efficacités relatives des substances.

### *d. Inconvénients*

- Il est préférable d'induire une restriction alimentaire, pour motiver l'animal. Celle-ci doit être effectuée dans le respect du bien être de l'animal et des considérations éthiques. Pour que la motivation résultant de cette restriction reste optimale, l'animal doit avoir le temps de consommer sa récompense entièrement.
- Les phases d'entraînement et d'habituation sont extrêmement importantes. En effet, la restriction de nourriture n'est quasiment plus nécessaire si l'animal est bien habitué et entraîné. Pendant ces phases s'effectue l'apprentissage des animaux. Cet apprentissage est soumis à toutes les contraintes du conditionnement et donc peut présenter de nombreuses variabilités. L'expérimentateur lui-même ne doit pas influencer le choix de l'animal.
- La composante spatiale est faible (le test a une configuration simple). Un seul item est à retenir.
- Un effet plancher des performances est rapidement atteint et ce test ne permet pas de mettre en évidence un effet pro-mnésiant d'un traitement chez des animaux intacts.

## III.4 Tâche d'appariement à un modèle

### III.4.1 Généralités

Le principal test représentant cette tâche est la reconnaissance d'objet (figure 36).

Le principe de cette technique est très simple et repose sur le comportement naturel d'exploration des rongeurs. Plusieurs publications font référence, notamment celles d'Ennaceur et Delacour <sup>(69)</sup> ou plus récemment de Bevins et Besheer <sup>(22)</sup>.

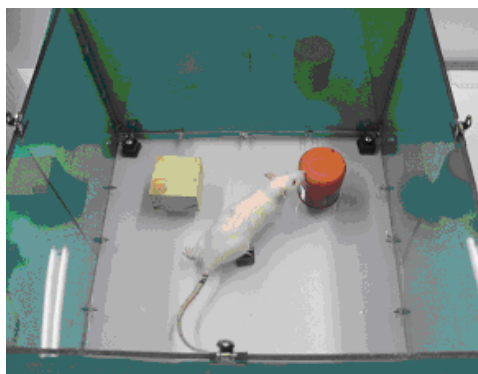


Figure 36 : le test de reconnaissance d'objet

### III.4.2 Reconnaissance d'objet

#### a. Principe

Les animaux explorent naturellement préférentiellement un objet inconnu.

Après une phase d'habituation à l'arène, les rats sont traités puis placés dans l'arène en présence de deux objets similaires (phase d'entraînement). Les temps passés à explorer chacun des objets sont enregistrés. Pendant la phase de test, les animaux sont en présence d'un objet familier (exploré pendant la phase d'entraînement) et d'un objet nouveau.

Un animal qui n'a pas de troubles mnésiques passera son temps d'exploration sur le nouvel objet <sup>(69)</sup>. L'administration d'une substance à effet amnésiant entraînera un déficit cognitif lors de l'entraînement et un défaut de mémorisation. Pendant la phase de test, l'animal explorera l'objet familier autant que le nouvel objet, ce qui suggère qu'il a « oublié » sa phase d'entraînement.

La substance est administrée avant l'entraînement (amnésie antérograde) ou après l'entraînement (amnésie rétrograde) selon la pharmacocinétique et la pharmacodynamie de la molécule.

#### b. Réalisation du test

Selon Ennaceur et Delacour, <sup>(69)</sup>, deux méthodes sont envisageables : une phase d'entraînement avec un objet ou avec deux objets.



### c. Paramètres

Selon Mitchell Montcalm <sup>(S10)</sup>, 55 variables sont à prendre en compte lors de la réalisation du test de reconnaissance d'objet. Ceux-ci dépendent des animaux, de leur hébergement ou des paramètres de la technique (figure 37).

| > 55 variables                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1- Age des rats<br>2- Alimentation des rats<br>3- Race des rats<br>4- Sexe des rats<br>5- Poids des rats/Nombre de rats par cage<br>6- Moment de la journée pour les nourrir<br>7- Durée d'obscurité dans leur journée<br>8- Durée de clarté dans leur journée<br>9- Nombre de rats par cage<br>10- Température de leur habitat<br>11- Nombre de jours dans l'animalerie<br>12- Couleur des objets<br>13- Hauteur des objets<br>14- Forme des objets<br>15- Matériau des objets<br>16- Poids des objets<br>17- Positionnement des objets<br>18- Saturation en odeur des objets<br>19- Intervalle entre les saturations en odeur<br>20- Grandeur de la chambre<br>21- Hauteur de la chambre<br>22- Matériau de la chambre<br>23- Litière dans le fond de la chambre<br>24- Changement de litière pour chaque cage<br>25- Saturation en odeur de la chambre<br>26- Uniformité d'éclairage dans la chambre<br>27- Lieu d'expérimentation isolé<br>28- Éclairage du lieu d'expérimentation<br>29- Présence ou non de l'expérimentateur<br>30- Uniformité du bruit de fond (ventilateur)<br>31- Nombre de jours pour la stabulation<br>32- Intervalle stabulation-apprentissage<br>33- Durée de stabulation par jour<br>34- Moment de la journée pour la stabulation<br>35- Intervalle déplacement des cages-appri.<br>36- Stimulation des rats avant l'appri.<br>37- Moment dans la journée pour l'appri.<br>38- Durée de l'apprentissage<br>39- Positionnement du rat dans la chambre au début de l'apprentissage<br>40- Prépondérance spatiale<br>41- Intervalle entre l'appri. et la reconn.<br>42- Dose de scopolamine<br>43- Dose de Ginkgo biloba<br>44- Intervalle entre l'injection du Ginkgo biloba et de la scopolamine<br>45- Injection d'eau saline pour les contrôles<br>46- Mode d'injection des produits<br>47- Stimulation des rats avant la reconn.<br>48- Durée de la reconnaissance<br>49- Moment dans la journée pour la reconn.<br>50- Intervalle entre l'injection de scopolamine et la reconnaissance<br>51- Positionnement du rat dans la chambre au début de la reconn.<br>52- Prépondérance pour un objet<br>53- Positionnement de l'objet nouveau et l'objet ancien aléatoire<br>54- Chronométrage en direct et une deuxième fois avec l'enregistrement<br>55- Distance entre le nez du rat et l'objet pour qu'il explore |

Figure 37 : Les 55 variables à prendre en compte pour la réalisation du test de reconnaissance d'objet selon Mitchell Montcalm <sup>(S10)</sup>.

- La technique de reconnaissance d'objet peut se réaliser sur des primates (non humain ou humain) et des rongeurs : des souris <sup>(20, 63)</sup> et des rats <sup>(39, 40, 69, 96, 113)</sup> de toutes les souches peuvent être utilisés.  
Les souris nécessitent un temps d'exploration plus long (10 min <sup>(63)</sup> contre 3-5 min pour les rats) car elles sont plus stressées et se concentrent donc moins facilement sur les objets à explorer. Des phases d'habituation plus nombreuses sont réalisées pour les souris. Les études publiées utilisent de façon indifférente les males <sup>(96)</sup> et femelles <sup>(39, 40)</sup> sans que la variabilité entre les sexes ne soit abordée. L'âge a évidemment un impact <sup>(40)</sup>. Les rats âgés pouvant présenter un déficit des

fonctions cognitives, les rats utilisés en général sont en général testés dans une tranche d'âge standard de 6 à 9 semaines.

- L'arène doit être suffisamment vaste par rapport à la taille de l'animal. En général, un environnement moins stressant pour l'animal (parois hautes et/ou sombres) diminuent l'anxiété chez les rats, et favorisent de ce fait l'exploration des objets <sup>(22)</sup>. Une odeur peut être associée à l'un des objets, en général du vinaigre <sup>(5)</sup>. L'arène est placée de telle sorte que les deux objets soient éclairés de façon identique.
- Les objets doivent répondre à plusieurs impératifs : ils doivent avoir un poids suffisant pour ne pas être déplacés par les rats, pour que leur sens de l'exploration ne soit pas biaisé par le mouvement de l'objet. Leur taille doit être assez importante pour être le principal point d'attraction dans l'openfield. Leur « attractivité » intrinsèque doit être équivalente ; celle-ci dépend de la taille, du poids, de la couleur, de l'odeur <sup>(5)</sup>. L'animal peut circuler librement derrière les objets sans les toucher.
- L'habituation a pour unique but de mettre les animaux en situation d'exploration, dans un environnement inconnu, de façon à éviter le stress trop important pendant la période d'entraînement qui pourrait diminuer le temps d'exploration des objets. Le nombre d'habituation peut varier entre 3 et 0 <sup>(66, 68, 69, 196)</sup>. Bibliographiquement, le temps d'habituation varie entre 3 min et 10 min <sup>(69, 96)</sup>.
- Les temps d'entraînement et de test doivent être égaux pour permettre la comparaison des temps d'exploration des objets. Des sessions d'entraînement et de test courtes sont recommandées, car plus le temps de test est long, plus le nouvel objet devient familier <sup>(22)</sup> ; l'effet de reconnaissance d'objet peut donc être diminué.
- Intervalle de « rétention ». Plusieurs intervalles de rétention de l'information peuvent être testés, notamment pour connaître quel est le temps auquel la différence entre les rats traités et les rats contrôle sera la plus importante <sup>(20)</sup>. De plus, il peut être intéressant de rechercher combien de temps perdure l'information.
- Lavage entre expériences. Deux possibilités se présentent : Tout peut être nettoyé, de façon à présenter à chaque animal un environnement nouveau. Ou bien, on ne nettoie pas les objets pour saturer en odeurs les objets et l'enceinte. Pour cela, il suffit de placer successivement plusieurs rats dans l'arène en présence des objets. Seule l'enceinte est nettoyée à l'alcool à 70° entre chaque animal. Les objets sont nettoyés à la fin de chaque session de test et présentés à des rats surnuméraires avant d'être utilisés pour le test.

#### d. Paramètres

Les paramètres mesurés sont définis par Delacour et Ennaceur <sup>(68, 69)</sup> et puis utilisés par de très nombreux auteurs <sup>(57, 125, 145)</sup>:

$T_F$  = temps passé sur l'objet F (familier)

$T_N$  = temps passé sur l'objet N (nouveau)

Plusieurs indices peuvent alors être calculés

- L'indice d'exploration (EI) correspond au temps total d'exploration des objets.  
 $EI = T_N + T_F$
- L'indice de reconnaissance (RI) correspond la proportion de temps que l'animal passe sur le nouvel objet ; il varie donc entre 0 et 100%.  
 $RI = [T_N / (T_N + T_F)] \times 100$
- L'indice de discrimination (DI) correspond à la proportion de temps que l'animal passe en plus à explorer le nouvel objet ; il varie donc entre -100% (si l'animal explore seulement l'objet familier) et 100% (si il n'explore que le nouvel objet)  
 $DI = [(T_N - T_F) / (T_N + T_F)] \times 100$

Les indices de reconnaissance et de discrimination suivent les mêmes variations mais l'indice de discrimination prend en compte le temps passé à explorer l'objet familier (figures 38 et 39).

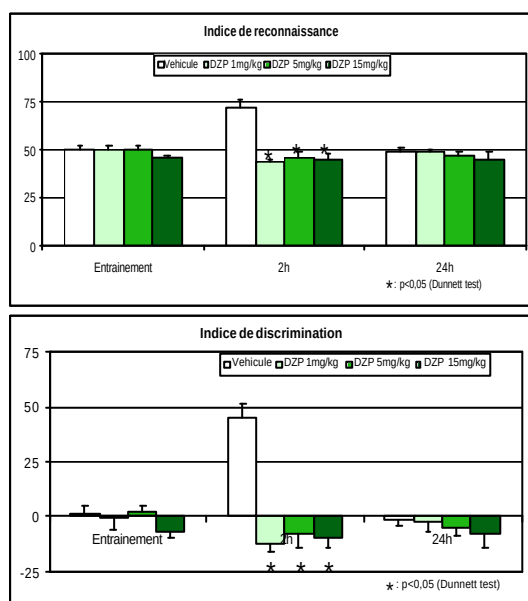


Figure 38 : indice de reconnaissance et de discrimination par temps. Les performances cognitives des rats traités au diazépam sont significativement différentes des performances cognitives des rats traités au véhicule ( $p < 0.05$  test de Dunnett).

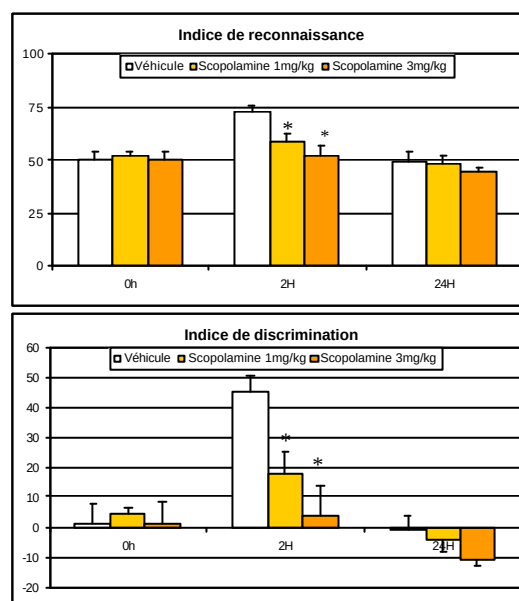


Figure 39 : indice de reconnaissance et de discrimination par temps. Au temps 2h, les performances cognitives des rats traités à la scopolamine sont significativement différentes des performances cognitives des rats traités au véhicule ( $p < 0.05$  test de Dunnett).

#### e. Avantages

- Cette méthode utilise le réflexe d'exploration naturel chez le rongeur. Certaines techniques provoquent un stress à l'animal : le labyrinthe en T nécessite une restriction alimentaire, le labyrinthe sec nécessite une restriction hydrique, la technique d'évaluation du temps d'immobilité des chocs électriques. Les labyrinthes aquatiques requièrent l'immersion des animaux. Dans ces conditions de stress, les capacités cérébrales physiologiques de l'animal peuvent être altérées et les résultats du test de mémoire biaisés. Dans la reconnaissance d'objet, aucun stimulus aversif n'est utilisé, aucune restriction n'est requise, aucun renforcement n'est utilisé. Théoriquement, le seul stress engendré est dû au traitement. Aucun conditionnement n'est requis. Les animaux sont donc moins stressés, mais aussi moins motivés.
- Le test est très court : une seule session de test est nécessaire ; les performances des rats pendant la phase de test sont comparées aux valeurs d'entraînement.
- Cette technique est très documentée et continue d'être utilisée pour l'évaluation des fonctions cognitives.
- Elle permet aussi dans certaines conditions d'apprécier l'aspect modulateur que peuvent avoir certaines substances pharmacologiques (113, 116, 128, 134, 140).
- De plus, ce test est basé sur la reconnaissance visuelle, et permet donc des comparaisons inter-espèces.
- Ce test simple et rapide peut être utilisé en première intention lors de l'évaluation de l'impact d'une substance sur les fonctions mnésiques, avant d'entreprendre des tests plus longs et complexes, comme les labyrinthes aquatiques.

#### f. Inconvénients

- Cette technique ne permet pas l'évaluation de l'apprentissage, mais uniquement de la mémoire court terme.
- L'altération des capacités visuelles ou des facultés locomotrices de l'animal entraînera un biais dans le résultat.
- L'enregistrement des passages des animaux reste indispensable pour une analyse du comportement de l'animal. Celle-ci peut par ailleurs être réalisée par plusieurs personnes et en aveugle, si possible.

## III.5 Discussion

Alors que la tâche de reconnaissance d'objet est un test qui permet d'évaluer la mémoire court terme des rongeurs, des tests plus complexes tels que le test du labyrinthe aquatique ou du labyrinthe en T permettent l'évaluation de l'apprentissage et de la mémoire court terme.

Les tests doivent être validés avec des substances de référence (scopolamine, MK-801).

Le rat étant apparu depuis le milieu du XIX<sup>ème</sup> siècle en recherche scientifique, une très grande quantité de données ont été accumulées sur la physiologie et le comportement de cette espèce. Elle reste l'espèce de prédilection en recherche comportementale.

Compte tenu des avancées récentes en génétique et de la plus grande facilité de manipulation génétique sur la souris, la recherche en neurosciences est de plus en plus réalisée sur les souris ; les tests originalement développés pour les rats sont utilisés par des souris.

Les différences inter-espèces n'ont pourtant pas toujours été prises en compte <sup>(192, 193)</sup>. Comme le dit Frick dans son article <sup>(75)</sup> : « les souris ne sont pas de petits rats » !

Les deux espèces présentent pourtant de grandes différences dans leur habitat naturel : les rats vivent dans des terriers souterrains proches de l'eau, ce qui explique que leur grande capacité à la nage. Les souris peuvent aussi apprendre des tâches dans l'eau, mais leur performance est moins bonne que les rats <sup>(192)</sup>. Les deux espèces montrent des niveaux d'apprentissage spatial comparables dans des labyrinthes « secs », tel que le labyrinthe radial <sup>(193)</sup>.

Les capacités d'apprentissage varient ainsi considérablement selon la pertinence éco-éthologiques des stimuli et des paramètres sélectionnés <sup>(108, 120)</sup>.

Des facteurs non-éthologiques peuvent jouer un rôle important dans les performances d'apprentissage.

Par exemple, dans les tests aquatiques, l'animal est immergé pendant quelques minutes. Si la température de l'eau est trop faible (moins de 24-26°C), la souris peut devenir sévèrement hypothermique, alors que le rat est plus résistant à une température plus faible. L'enregistrement de la température de l'eau est alors crucial pour l'obtention de données valides <sup>(93)</sup>.

Tous les tests peuvent être utilisés indifféremment chez la souris ou chez le rat, mais les protocoles doivent prendre en compte les spécificités de l'espèce pour les observations comportementales.

Les données obtenues chez la souris dans un labyrinthe aquatique peuvent être sévèrement affectées par le thigmotactisme, c'est-à-dire le comportement des souris dans un environnement qui consiste à rester en contact proche avec les murs ou cloison de son environnement <sup>(197)</sup>. Celui-ci est considéré comme une réponse émotionnelle (anxiété à traverser l'espace) <sup>(17)</sup>.

Les mauvais résultats liés au thigmotactisme ne doivent pas être seulement considérés comme les conséquences de perturbations des fonctions mnésiques mais comme la révélation de perturbations émotionnelles. Le labyrinthe aquatique de Morris est un test d'apprentissage basé sur une motivation aversive ; en effet, la motivation de l'animal est la peur de la noyade. Par conséquent, l'acquisition de la tâche reste un événement stressant et ce, même lorsque les facteurs aversifs sont réduits au minimum <sup>(73)</sup>.

Afin de comprendre si une donnée expérimentale reflète bien le comportement recherché, et pour éviter de confondre un comportement de l'animal avec un autre, il est toujours utile de visualiser les tests des

animaux. Un enregistrement vidéo est le plus souvent recommandé. Les examinateurs peuvent alors analyser le signal plusieurs fois et de façon plus précise.

Ainsi, des observations précises de souris testées dans un labyrinthe radial non équipé de portes à l'entrée des bras ont entraîné une mauvaise interprétation du résultat car les souris ne présentaient pas d'apprentissage spatial, mais seulement une alternance non spatiale..

#### Rapprochement des tests des conditions naturelles

Bien qu'une approche semi-naturaliste pour l'étude de l'apprentissage et de la mémoire ait été longuement étudiée chez les oiseaux <sup>(41, 166)</sup> et moins fréquemment chez le rongeur, la nécessité de réaliser des protocoles plus orientés « éthologie » est de plus en plus discutée <sup>(32)</sup>.

Beaucoup de chercheurs sont conscients du caractère artificiel des conditions de laboratoire dans lesquelles le rongeur peut parfois avoir des comportements non naturels qui peuvent interférer avec les tâches d'apprentissage.

Comprendre le comportement naturel d'apprentissage des rongeurs peut être important pour :

- comprendre les processus cognitifs sensibles à la sélection naturelle,
- reconnaître la pertinence écologique des réponses comportementales sélectionnées,
- développer de nouvelles stratégies et valider les tests couramment utilisés en laboratoire <sup>(61)</sup>.

Une approche semi-naturaliste peut révéler des comportements qui ne seraient pas détectés dans les tests en conditions de laboratoire standard. De plus, il apparaît que un environnement semi-naturaliste n'est pas seulement bénéfique pour les fonctions cognitives, mais aussi pour la recherche en neurosciences dans son ensemble. Par exemple, la neurogénèse de l'hippocampe chez le rat apparaîtrait facilitée si l'animal vit dans un environnement complexe (terrier développé par Blanchard et Blanchard <sup>(25)</sup>, par rapport à un environnement standard de laboratoire <sup>(82)</sup>.

Le stress affecte tout particulièrement les fonctions mnésiques de l'animal.

- le degré de vigilance, d'éveil, d'attention et de concentration. Des troubles de l'attention peuvent diminuer radicalement les performances mnésiques. L'effort conscient de répétition ou d'intégration de l'information améliore les capacités mnésiques. En clinique, l'attention joue un rôle important dans l'analyse de la neurotoxicité ; Des déficits de l'attention se traduisent chez l'homme par de l'hyperactivité, de l'impulsivité ou de l'inattention. Ces trois paramètres sont difficilement quantifiables simultanément à la mémoire chez l'animal.
- l'intérêt, la force de motivation, le besoin ou la nécessité. La motivation est un facteur qui favorise la mémoire.
- les valeurs affectives attribuées au matériel à mémoriser, l'humeur et le degré d'émotion de l'individu. L'état émotionnel lors d'un événement peut influencer grandement son souvenir. Le traitement mnésique des événements chargés d'émotion fait intervenir la noradrénaline, et ce neurotransmetteur est libéré en plus grande quantité lorsque nous sommes excités ou tendus.
- le lieu, l'éclairage, l'odeur, les bruits, bref tout le contexte présent lors de la mémorisation s'enregistre avec les données à mémoriser. Nos systèmes mnésiques sont donc contextuels ; par conséquent, le rappel du contexte amène, par association successive, à l'information pertinente.

Un autre aspect important dans les phénomènes de mémorisation est l'oubli. L'oubli permet de nous débarrasser de l'énorme quantité d'informations que nous traitons tous les jours et qui est jugée sans utilité pour l'avenir.

De la même façon que dans les tests d'évaluation de la dépendance, la pharmacocinétique des substances administrées joue un rôle prépondérant dans l'acquisition des performances mnésiques. En effet, les séances d'acquisition de la tâche à accomplir doivent être réalisées au moment du pic d'exposition de l'animal à la substance à tester.

Les études chez l'animal utilisent généralement des protocoles expérimentaux destinés à l'évaluation des comportements spécifiques et sont basés sur des méthodes dérivant du conditionnement opérant. Ainsi, une tâche comme l'apprentissage est représentée par un comportement précis réalisé dans une condition déterminée par le test.

Chez l'homme, les évaluations comportementales se déroulent grâce à des instruments de tests standardisés. Ceux-ci permettent une analyse plus globale du comportement. De cette façon, l'interprétation d'un simple test de mémoire est mise en parallèle avec l'interprétation de tests émotifs et de réflexes.

Par ailleurs, les tests étant différents chez l'homme et chez l'animal, leur sensibilité et spécificité sont évidemment incomparables. Afin de pouvoir comparer les résultats de l'animal chez l'homme, des tests similaires et des observations identiques peuvent être réalisés chez les deux espèces. Une similarité dans les observations renforce alors l'extrapolation inter-espèce et permet la validation de l'espèce animale pour des investigations supplémentaires.

L'extrapolation des résultats des tests chez le primate jusqu'à l'homme s'avère plus aisée que chez le rongeur. Les réactions, comportements, et observations étant comparables lors des tests, le primate reste l'espèce la plus prédictive quant à un effet sur l'homme <sup>(170)</sup>.





## **IV CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

Les tests d'évaluation des fonctions du système nerveux central et plus généralement de neurotoxicité prennent une place de plus en plus importante dans l'évaluation des nouvelles substances. Ceux-ci nécessitent une approche pluridisciplinaire : pharmacologie, toxicologie, pharmacocinétique, neurobiologie, neuroanatomie et comportement doivent être prises en considération.

Comme dans toute expérimentation animale, les caractéristiques des animaux (espèce, souche, sexe, âge, poids, spécificités métaboliques), et celles de la substance active (demi-vie, administration simultanée de nourriture, interactions) entraînent des variations dans la réponse. Les rongeurs sont utilisés de façon standard dans ces tests comportementaux, mais du fait de la complexité des problématiques (addiction ou mémoire), les primates sont une espèce dont les résultats sont extrêmement prédictifs. Les réponses varient selon la souche, l'âge, le sexe, mettant ainsi en évidence des terrains prédisposants ou plus sensibles à l'instauration d'une dépendance ou à l'induction d'une amnésie.

Dans ces tests comportementaux sont rencontrées des espèces utilisées de façon moins courante en expérimentation animale, tels que la gerbille ou le pigeon. Ces animaux possèdent des caractéristiques propres (pharmacodynamie et pharmacocinétique) dont il faut tenir compte avant tout traitement.

Ces tests comportementaux présentent des spécificités propres. Et les conditions du test jouent un rôle primordial dans l'élaboration d'une réponse sensible et spécifique de l'animal.

La pharmacocinétique joue un rôle primordial dans la conception des protocoles et dans l'interprétation des résultats puisqu'il devient très important de synchroniser les pics d'absorption de la substance et les phases de conditionnement ou de test.

Les animaux doivent être manipulés dans des conditions très précises et délicates. Toute variabilité due aux conditions extérieures doit être réduite au minimum car celles-ci ont un impact considérable sur les facultés d'apprentissage des animaux. Un stress causé par des signaux externes tels que le traitement, le bruit ambiant ou encore la luminosité trop importante, peuvent altérer considérablement la qualité du conditionnement et donc de l'apprentissage.

Le stress a une influence majeure sur les comportements des animaux, à la fois sur les capacités d'apprentissage et sur le comportement de consommation de substance. Il est d'autant plus important de contrôler et de minimiser le stress et d'inconfort des animaux afin d'optimiser les résultats du test et leur interprétation.

L'expérimentateur lui-même doit adopter un comportement particulier et une position spatiale précise de façon à ne pas influencer l'animal ni dans son conditionnement ni dans ses éventuels choix.

Les comités d'éthique jouent alors un rôle très important pour révision des protocoles, particulièrement dans les tests pour l'évaluation de l'addiction, car le bien-être de l'animal dans ce type de test est directement mis en question.

Ces tests sont utilisés de façon très répandue dans la recherche fondamentale, historiquement sur des animaux avec des lésions cérébrales (hippocampe, amygdale) puis sur des animaux déficients en récepteurs (récepteurs NMDA ou  $\mu$ ), et aujourd'hui sur des animaux génétiquement modifiés (modèles d'Alzheimer), permettant ainsi l'exploration des processus cérébraux de la mémoire et de la dépendance (mécanismes cérébraux, moléculaires et pathologiques). Compte-tenu des problématiques actuelles, les tests comportementaux sont aussi régulièrement utilisés dans le développement de médicament.

Les observations histopathologiques réalisées lors des études de toxicologie englobent les structures cérébrales importantes pour certaines fonctions comportementales (hippocampe et mémoire, système limbique et émotion, hypothalamus et fonction endocrine). Le choix du test comportemental dépend

alors totalement de la problématique soulevée. Certains tests sont simples à réaliser mais peuvent manquer de sensibilité, alors que d'autres tests sont plus sensibles mais beaucoup plus complexes et onéreux. D'un autre côté, la batterie d'observation fonctionnelle a montré être plus sensible qu'un test plus complexe (tache de conditionnement opérant) dans la détection des effets liés à un traitement <sup>(127)</sup>. Comme cela a déjà été le cas pour la batterie d'observation fonctionnelle (ou FOB), les évaluations des fonctions du SNC tendent à être incorporées progressivement dans les tests de toxicologie (ligne directrice de l'OCDE 422).

De cette façon, les résultats sont optimisés et le nombre d'animaux est réduit, ce qui s'accorde totalement avec les nécessaires considérations éthiques à prendre en compte en expérimentation animale.



## **V BIBLIOGRAPHIE - SITOGRAFIE**

## Bibliographie

1. Allison, C., Pratt, J.A. (2006). Differential effects of two chronic diazepam treatment regimes on withdrawal anxiety and AMPA receptor characteristics. *Neuropsychopharmacology* 31, 602-619.
2. Amit, Z., Smith, B.R., Sutherland, E.A. (1987). Oral Self-Administration of Alcohol: A Valid Approach to the Study of Drug Self-Administration and Human Alcoholism In: Bozarth M.A.(Eds.), *Methods of assessing the reinforcing properties of abused drugs*. pp. 143-160. New York: Springer-Verlag.
3. Amitai, N., Liu, J., Schulteis, G. (2006). Discrete Cues Paired with Naloxone-Precipitated Withdrawal from Acute Morphine Dependence Elicit Conditioned Withdrawal Responses. *Behav. Pharmacol.* 17(3), 213–222.
4. Anagnostaras, S.G., Gale, G.D., Fanselow, M.S. (2001). Hippocampus and contextual fear conditioning: recent controversies and advances. *Hippocampus* 11, 8-17.
5. Astur, R.S., Klein, R.L., Mumby, D.G., *et al.* (2002). A Role for Olfaction in Object Recognition by Normal and Hippocampal-Damaged Rats. *Neurobiol. Learn. Memory* 78, 186–191.
6. Ator, N.A., Griffiths R.R. (1997). Selectivity in the Generalization Profile in Baboons Trained to Discriminate Lorazepam: Benzodiazepines, Barbiturates and Other Sedative/Anxiolytics. *J. Pharmacol. Exp. Thera.* 282:1442–1457.
7. Ator, N.A., Griffiths, R.R (2003). Principles of drug abuse liability assessment in laboratory animals. *Drug Alcohol Depend.*, 70, 55-72.
8. Ator, N.A., Griffiths, R.R. (1999). Drug Discrimination Analysis of Partial Agonists at the Benzodiazepine Site. I. Differential Effects of U-78875 across Training Conditions in Baboons and Rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 289,1434–1446.
9. Balster, R.L., Johanson, C.E, Harris, R.T., *et al.* (1973). Phencyclidine self-administration in the rhesus monkey. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 1, 167-172.
10. Balster, R.L., Kilbey, M.M., Ellinwood, E.H., Jr. (1976). Methamphetamine self-administration in the cat. *Psychopharmacologia* 46, 229-233.
11. Balster, R.L., Schuster, C.R. (1973). A comparison of d-amphetamine, l-amphetamine, and methamphetamine self-administration in rhesus monkeys. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 1, 67-71.
12. Balster, R.L., Woolverton, W.L. (1980). Continuous-access phencyclidine self-administration by rhesus monkeys leading to physical dependence. *Psychopharmacology* 70, 5-10.
13. Bardo, M.T., Rowlett, J.K., Harris, M.J. (1995). Conditioned place preference using opiate and stimulant drugs: a meta-analysis. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 19(1); 39-51.
14. Barnes, C.A. (1979). Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 93, 74-104.
15. Baron, A., Derenne, A. (2000). Progressive-ratio schedules: Effects of later schedule requirements on earlier performances. *J. Exp. Anal. Behav.* 73, 291–304.
16. Bedford, J.A. (1973). Drug self-administration in the pig. *Dissertation Abstracts International*, 34, 1767-B.
17. Belzung, C. (1999). Measuring rodent exploratory behavior. In: Crusio, W.E., Gerlai, R.T. (Eds.). *Handbook of molecular-genetic techniques for brain and behavior research*. Amsterdam: Elsevier; 1999. p. 739-749.
18. Bergeron, M. (1995). Dictionnaire de la réadaptation, tome 1 : termes techniques d'évaluation. Les Publications du Québec, 1995, p. 43.
19. Berrendero, F., Mendizabal, V., Robledo, P., *et al.* (2005). Nicotine-Induced Antinociception, Rewarding Effects, and Physical Dependence Are Decreased in Mice Lacking the Preproenkephalin Gene. *J. Neurosci.* 25(5), 1103–1112.

20. Bertaina-Anglade, V., Enjuanes, E., Morillon, D., *et al.* (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(2), 99-105.
21. Berthe, B. (2003) – Validation de deux tests de mémorisation spatiale : piscine de Morris et labyrinthe aquatique triple T dans le processus 'apprentissage et de mémorisation chez le rat. Mémoire de stage de Licence.
22. Bevins, R., Besheer, J. (2006). Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. *Nat.Prot.*, 1, 1306 – 1311.
23. Bevins, R.A. (2005). The Reference-Dose Place Conditioning Procedure Yields a Graded Dose-Effect Function. *Int. J. Comp. Psych.* 2005, 18, 101-111.
24. Bilgi, C., Tokgöz, S., Aydin, A., *et al.* (2003). The Effects Of Chronic Ethanol Consumption And Ethanol Withdrawal On Serum Cholinesterase Activity In Rats. *Alcohol Alcohol.*, Vol. 38, No. 4, pp. 316–320.
25. Blanchard, R.J., Blanchard, D.C. (1989). Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. *J. Comp. Psychol.*, 103, 70-82.
26. Bontempi, B., Whelan, K.T., Risbrough, V.B., *et al.* (2003). Cognitive Enhancing Properties and Tolerability of Cholinergic Agents in Mice: A Comparative Study of Nicotine, Donepezil, and SIB-1553A, a Subtype-Selective Ligand for Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Neuropsychopharmacology*, 28, 1235–1246.
27. Bozarth, M.A. (1987). An overview of assessing drug reinforcement. In: Bozarth M.A. (Eds.), *Methods of assessing the reinforcing properties of abused drugs*, 1987 pp. 635-658.
28. Bozarth, M.A. (1987). Conditioned place preference: A parametric analysis using systemic heroin injections. In: Bozarth M.A. (Eds.), *Methods of assessing the reinforcing properties of abused drugs*, 1987 pp. 241-273.
29. Bozarth, M.A., Gerber, G.J., Wise, R.A. (1980). Intracranial self-administration as a technique to study the reward properties of drugs of abuse. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 13(Suppl. 1), 245-247.
30. Bozarth, M.A., Wise, R.A. (1985). Toxicity associated with long-term intravenous heroin and cocaine self-administration in the rat. *J. Am. Med. Assoc.*, 254, 81-83.
31. Brady, J.V., Griffiths, R.R. (1977). Drug-maintained performance procedures and the assessment of drug abuse liability. In: Thompson, T., Unna, K.R. (Eds.), *Predicting Dependence Liability of Stimulant and Depressant Drugs*, 1987 pp. 165-184. Baltimore: University Park Press.
32. Branchi, I., Ricceri, L. (2004). Refining learning and memory assessment in laboratory rodents. An ethological perspective. *Ann. Ist. Super. Sanità*, 40(2), 231-236.
33. Budygin, E.A., Brodie, M.S., Sotnikova, T.D., *et al.* (2004). Dissociation of rewarding and dopamine transporter-mediated properties of amphetamine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101(20), 7781–7786.
34. Buga, G.M., Frank, J.S., Mottino, G.A., *et al.* (2006). D-4F decreases brain arteriole inflammation and improves cognitive performance in LDL receptor-null mice on a Western diet. *J. Lipid Res.* 47, 2148-2160.
35. Chao, J., Nestler, E. (2004). Molecular neurobiology of drug addiction. *Annu. Rev. Med.*, 55, 113-32.
36. Chelarescu, D., Nechifor, M. (2005). The method of conditioned place preference in pharmacodependence research. *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi.*, 109(2), 355-359.
37. Chen, R., Tilley, M.R., Wei, H., *et al.* (2006). Abolished cocaine reward in mice with a cocaine-insensitive dopamine transporter. *PNAS* 2006. 103 no. 24: 9333–9338.
38. Chen, S.A., O'Dell, L.E., Hoefer, M.E., Greenwell, T.N. *et al.* (2006). Unlimited Access to Heroin Self-Administration: Independent Motivational Markers of Opiate Dependence. *Neuropsychopharmacol.* (2006) 31, 2692–2707.

39. Chopin, P., Colpaert, F.C., Marien, M. (2002). Effects of Acute and Subchronic Administration of Dexefaroxan, an alpha2-Adrenoceptor Antagonist, on Memory Performance in Young Adult and Aged Rodents. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Vol. 301, No. 1.
40. Clark, R.E., Zola, S.M., Squire, L.R. (2000). Impaired Recognition Memory in Rats after Damage to the Hippocampus. *J. Neurosci.*, 20, 8853–8886.
41. Clayton, N.S., Krebs, J.R. (1995). Lateralization in memory and the avian hippocampus in food-storing birds. In: Alleva, E., Fasolo, A., Lipp, H.P., *et al.* (Eds.) Behavioural brain research in naturalistic and semi-naturalistic settings. Dordrecht: Kluwer, 1995. p. 139-158.
42. Collier, H.O., Francis, D.L., Henderson, G., *et al.* (1974). Quasi morphine-abstinence syndrome. *Nature*, 249, 471-473.
43. Colpaert, F.C. (1987). Drug Discrimination: Methods of Manipulation Measurement, and Analysis. Reprinted from Colpaert, F.C. (1987), Drug discrimination: Methods of manipulation, measurement, and analysis. In: Bozarth, M.A. (Eds.), Methods of assessing the reinforcing properties of abused drugs (pp. 341-372).
44. Colpaert, F.C. (1988). Intrinsic activities and discriminative effects of drugs. *Psychopharmacol. Ser.*, 4, 154-160.
45. Colpaert, F.C. (1995). Drug discrimination: no evidence for tolerance to opiates. *Pharmacol. Rev.*, 47, 605-629.
46. Colpaert, F.C. (1999). Drug Discrimination in Neurobiology. *Pharmacol.Biochem. Behav.*, Volume 64, Number 2, pp. 337-345.
47. Colpaert, F.C. (2003). Discovering risperidone: the LSD model of psychopharmacology. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2, 315-320.
48. Colpaert, F.C., Rosecrans, J.A. (1978). Stimulus properties of drugs: Ten years of progress. Amsterdam: Elsevier/North Holland Biomedical Press 1978.
49. Committee For Medicinal Products For Human Use (CHMP) Guideline On The Non-Clinical Investigation Of The Dependence Potential Of Medicinal Products. London, 23 March 2006 EMEA/CHMP/SWP/94227/2004.
50. Corcoran, K.A., Lu, Y., Turner, R.S., *et al.* (2002). Overexpression of hAPPswe Impairs Rewarded Alternation and Contextual Fear Conditioning in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Learn. Memory* 9, 243–252.
51. Costa, B., Giagnoni, G., Colleoni, M. (2000). Precipitated and spontaneous withdrawal in rats tolerant to anandamide. *Psychopharmacol.* 149: 121-128.
52. Cowan, A. (1976). Use of the mouse-jumping test for estimating antagonistic potencies of morphine antagonists. *J. Pharm. Pharmacol.*, 28, 177-182.
53. Criswell, H.E., Ridings, A. (1983). Intravenous self-administration of morphine by naive mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 18, 467-470.
54. Crusio, W.E. (1999). Methodological considerations for testing learning in mice. In: Crusio, W.E., Gerlai, R.T. (Eds.). Handbook of molecular-genetic techniques for brain and behavior research. Amsterdam: Elsevier, 1999, p. 638-651.
55. D'Hooge, R., De Deyn, P.P. (2001). Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res. Rev.*, 36, 60-90.
56. Davis, C.M., Roma, P.G., Dominguez, J.M., *et al.* (2007). Morphine-induced place conditioning in Fischer and Lewis rats: Acquisition and dose-response in a fully biased procedure. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 86: 516–523.
57. Davis, W., Smith, S. (1987). Conditioned reinforcement as a measure of the rewarding properties of drugs. In: Bozarth M.A. (Eds.), Methods of assessing the reinforcing properties of abused drugs, 1987, pp. 199-210.
58. De Wit, H., Johanson, C.E. (1987). A drug preference procedure for use with human volunteers. In: Bozarth M.A. (Eds.), Methods of assessing the reinforcing properties of abused drugs, 1987, pp. 559-572.



59. Deacon, R.J.M. (2006). Appetitive position discrimination in the T-maze. *Nature prot.* 1(1), 13-15.
60. Deacon, R.M.J., Rawlins, J.N.P. (2006). T-maze alternation in the rodent. *Nature prot.* 1(1), 7-12.
61. Dell'Omo, G., Ricceri, L., Wolfer, D.P. *et al.* (2000). Temporal and spatial adaptation to food restriction in mice under naturalistic conditions. *Behav. Brain Res.*, 115, 1-8.
62. Deneau, G., Yanagita, T., Seevers, M.H. (1969). Self-administration of psychoactive substances by the monkey. *Psychopharmacologia*, 16, 30-48.
63. Dodart, J.C., Mathis, C., Ungerer, A. (1997). Scopolamine-induced deficits in a two-trial object recognition task in mice. *Neuroreport*, 24, 8, 1173-1178.
64. Downs, D.A., Woods, J.H. (1975). Fixed-ratio escape and avoidance-escape from naloxone in morphine-dependent monkeys: Effects of naloxone dose and morphine pretreatment. *J. Exp. Anal. Behav.*, 23, 415-427.
65. Dykstra, L.A., Preston, K.L., Bigelow, G.E. (1997). Discriminative stimulus and subjective effects of opioids with mu and kappa activities: data from laboratory animals and human subjects. *Psychopharmacology*, 130, 14-27.
66. Eacott, M.J., Norman, G. (2004). Integrated Memory for Object, Place, and Context in Rats: A Possible Model of Episodic-Like Memory?. *J. Neurosci.*, 24, 1948-1953.
67. Easterling, K.W., Holtzman, S.G. (1999). Discriminative Stimulus Effects of Naltrexone After a Single Dose of Morphine in the Rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 288:1269-1277.
68. Ennaceur, A., Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav. Brain Res.*, 31, 47-59.
69. Ennaceur, A., Meliani, K. (1992). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. III. Spatial vs. non-spatial working memory. *Behav. Brain Res.*, 51, 83-92.
70. Estrada, U., Villarreal, J.E., Schuster, C.R. (1976). Self-administration of stimulant drugs as a function of the dose per injection. Committee on Problems of Drug Dependence, Appendix 27, 5056-5059.
71. Fernandez Espejo, E., Cador, M., Stinus, L. (1995). Ethopharmacological analysis of naloxone-precipitated morphine withdrawal syndrome in rats: a newly-developed "etho-score". *Psychopharmacology*, 122, 122-130.
72. Fernandez Espejo, E., Serrano, M.I., Caillé, S., *et al.* (2001). Behavioral Expression of Opiate Withdrawal is Altered after Prefrontocortical Dopamine Depletion in Rats: Monoaminergic Correlates. *Neuropsychopharmacology*, Vol. 25, N°2.
73. Francis, D.D., Zaharia, M.D., Shanks, N., *et al.* (1995). Stress-induced disturbances in Morris water-maze performance: interstrain variability. *Physiol. Behav.*, 58, 57-65.
74. Frenois, F. (2003). Thèse d'université. Caractérisation des propriétés motivationnelles du sevrage des opiacés. Analyse comparative des substrats neurobiologiques des effets inconditionnés et conditionnés. Victor Segalen Bordeaux 2. Année 2003. Présentée et soutenue publiquement le 21 octobre 2003.
75. Frick, K.M., Stillner, E.T., Berger-Sweeney, J. (2000). Mice are not little rats: species differences in a one-day water maze task. *Neuroreport*, 11, 3461-3465.
76. Fudala, P.J., Teoh, K.W., Iwamoto, E.T. (1985). Pharmacologic characterization of nicotine-induced conditioned place preference. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 22(2): 237-241.
77. Gellert, V.F., Holtzman, S.G. (1978). Development and maintenance of morphine tolerance and dependence in the rat by scheduled access to morphine drinking solutions. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 205, 536-546.
78. Gerdjikov, T.V., Beninger, R.J. (2006). Place preference induced by nucleus accumbens amphetamine is impaired by local blockade of Group II metabotropic glutamate receptors in rats. *Neurosci.* 2006, 7:43.
79. Gerlai, R., Roder, J. (1995). Abnormal Exploratory Behavior in Transgenic Mice Carrying Multiple Copies of the Human Gene for S1001O. *J. Psychiatr. Neurosci.*, 20, 2, 105-112.

80. Goldberg, S.R. (1973). Comparable behavior maintained under fixed-ratio and second-order schedules of food presentation, cocaine injection or d-amphetamine injection in the squirrel monkey. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 186, 18-30.
81. Gong, Y., Min, L.V., Zhu, Y., et al. (2007). Endogenous histamine inhibits the development of morphine-induced conditioned place preference. *Acta Pharmacol Sin*, 1, 10-18.
82. Gould, E. (2002). Adult neurogenesis in the mammalian brain. Paris, France: FENS meeting; 2002.
83. Griffiths, R.R., Findley, J.D., Brady, J.V., et al. (1975). Comparison of progressive-ratio performance maintained by cocaine, methylphenidate and secobarbital. *Psychopharmacologia*, 43, 81-83.
84. Griffiths, R.R., Lukas, S.E., Bradford, L.D., et al. (1981). Self-injection of barbiturates and benzodiazepines in baboons. *Psychopharmacology*, 75, 101-109.
85. Griffiths, R.R., Winger, G., Brady, J.V., et al. (1976). Comparison of behavior maintained by infusions of eight phenylethylamines in baboons. *Psychopharmacology*, 50, 251-258.
86. Harrigan, S.E., Downs, D.A. (1978). Self-administration of heroin, acetylmethadol, morphine, and methadone in rhesus monkeys. *Life Sci.*, 22, 619-624.
87. Harris, G.C., Aston-Jones, G. (2003). Altered Motivation and Learning Following Opiate Withdrawal: Evidence for Prolonged Dysregulation of Reward Processing. *Neuropsychopharmacology*, 28, 865-871.
88. Herling, S., Woods, J.H. (1981). Discriminative stimulus effects of narcotics: Evidence for multiple receptor-mediated actions. *Life Sci.*, 28, 1571-1582.
89. Hodos, W. (1961). Progressive ratio as a measure of reward strength. *Science*, 134, 943.
90. Hodos, W., Kalman, J. (1963). Effects of increment size and reinforcer volume on progressive-ratio performance. *J. Exp. Anal. Behav.*, 6, 387-392.
91. Holtzman, S.G. (1982). Phencyclidine-like discriminative stimulus properties of psychotomimetic opioids. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 398, 230-240.
92. Holtzman, S.G. (1985). Drug discrimination studies. *Drug Alcohol Depend.*, 14, 263-282.
93. Iivonen, H., Nurminen, L., Harri, M., et al. (2003). Hypothermia in mice tested in Morris water maze. *Behav. Brain Res.*, 141, 207-213.
94. International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, Tenth Revision, 2nd edition (ICD-10). World Health Organisation. ISBN 92 4 154660 3.
95. Ivens, I.A., Schmuck, G., Machemarf, M. (1998). Learning and Memory of Rats after Long-Term Administration of Low Doses of Parathion. *Toxicol. Sci.* 46, 101-111.
96. Izaute, M., Bacon, E. (2005). Specific Effects of an Amnesic Drug: Effect of Lorazepam on Study Time Allocation and on Judgment of Learning. *Neuropsychopharmacology*, 30, 196-204.
97. Jacob, J.J.C., Michaud, G.M., Tremblay, E.C. (1979). Mixed agonist-antagonist opiates and physical dependence. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 7, 291-296.
98. Jacob, M.S., Sellers, E.M. (1979). Use of drugs with dependence liability. *CMA Journal*, Vol. 121, 717-724.
99. Johanson, C.E., Balster, R.L., Bonese, K. (1976). Self-administration of psychomotor stimulant drugs: The effects of unlimited access. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 4, 45-51.
100. Johanson, C.E., Kandel, D.A., Bonese, K. (1976). The effects of perphenazine on self-administration behavior. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 4, 427-433.
101. Johanson, C.E., Schuster, C.R. (1975). A choice procedure for drug reinforcers: Cocaine and methylphenidate in the rhesus monkey. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 193, 675-688.
102. Jones, B.E., Prada, J.A. (1973). Relapse to morphine use in dog. *Psychopharmacologia*, 30, 1-12.
103. Jones, K.L., Zhu, H., Jenab, S., et al. (2002). Attenuation of Acute Morphine Withdrawal in the Neonatal Rat by the Competitive NMDA Receptor Antagonist LY235959. *Neuropsychopharmacology* Vol 26, N°3.

104. Kalinichev, M., Holtzman, S.G. (2003). Changes in Urination/Defecation, Auditory Startle Response, and Startle-Induced Ultrasonic Vocalizations in Rats Undergoing Morphine Withdrawal: Similarities and Differences between Acute and Chronic Dependence. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 304, 603–609.
105. Kalivas, P.W., Peters, J., Knackstedt, L. (2006). Animal models and brain circuit in drug addiction. Molecular intervention. Volume 6, Issue 6.
106. Kamien, J.B. (1986). The effects of (+/-)-methylenedioxymethamphetamine and (+/-)-methylenedioxyamphetamine in monkeys trained to discriminate (+)-amphetamine from saline. *Drug. Alcohol. Depend.* 18(2), 139-147.
107. Kamien, J.B., Bickel, W.K., Hughes, J.R., *et al.* (1993). Drug discrimination by humans compared to non-humans: current status and future directions. *Psychopharmacology (Berl.)*, 111, 259-270.
108. Kamil, A.C., Mauldin, J.E. (1988). A comparative-ecological approach to the study of learning. In: Bolles, R.C., Beecher, M.D. (Eds.). *Evolution and learning*. Hillsdale, NJ: Lawrence Erlbaum Associates, Publishers; 1988.
109. Koch, J.M., Patullo, B.W., Macmillan, D.L. (2006). Exploring with damaged antennae: do crayfish compensate for injuries? *J. Exp. Biol.* 209, 3226-3233.
110. Kramer, J.C., Fischman, V.S., Littlefield, D.C. (1967). Amphetamine abuse. Pattern and effects of high doses taken intravenously. *J. Am. Med. Assoc.*, 201, 305-309.
111. Le Foll, B., Goldberg, S.R. (2005). Nicotine induces conditioned place preferences over a large range of doses in rats. *Psychopharmacol. (Berl)* 178(4), 481-492.
112. Lemaire, G.A., Meisch, R.A. (1984). Pentobarbital Self-Administration In Rhesus Monkeys: Drug Concentration And Fixed-Ratio Size Interactions. *J. Exp. Anal. Behav.* 42, 37-49.
113. Lieben, C., Blokland, A., Sik, A., *et al.* (2005). The Selective 5-HT<sub>6</sub> Receptor Antagonist Ro4368554 Restores Memory Performance in Cholinergic and Serotonergic Models of Memory Deficiency in the Rat. *Neuropsychopharmacology* 30, 2169–2179.
114. Lignes directrice à l'intention de l'Industrie. Études pharmacologiques d'innocuité des produits pharmaceutiques pour usage humain. ICH thème S7A. Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals ICH Topic S7A – 2006.
115. Liu, Y., Roberts, D.C.S, Morgan, D. (2005). Sensitization of the reinforcing effects of self-administered cocaine in rats: effects of dose and intravenous injection speed. *Eur. J. Neurosci.* 22(1), 195–200.
116. Luine, V.N., Jacome, L.F., Maclusky, N.J. (2003). Rapid Enhancement of Visual and Place Memory by Estrogens in Rats. *Endocrinology* 144(7), 2836–2844.
117. Lukas, S.E., Griffiths, R.R., Bradford, L.D., *et al.* (1982). A tethering system for intravenous and intragastric drug administration in the baboon. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 17, 823-829.
118. Lyvers, M. (1997). Drug Addiction as a “Physical Disease:” The Role of Physical Dependence and other Chronic Drug-Induced Neurophysiological Changes in Compulsive Drug Self-Administration. *Exp. Clin. Psychopharmacol.* 6(1), 107-125.
119. Mamiya, T., Ukai, M. (2001). [Gly14]-Humanin improved the learning and memory impairment induced by scopolamine in vivo. *Br. J. Pharmacol.* 134, 1597-1599.
120. Martin, P., Bateson, P. (1993). *Measuring behaviour. An introductory guide*. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 1993.
121. McMahon, L.R., France, C.P. (2006). Differential behavioral effects of low efficacy positive GABAA modulators in combination with benzodiazepines and a neuroactive steroid in rhesus monkeys. *Br. J. Pharmacol.* 147, 260–268.
122. Meisch, R.A., Carroll, M.E. (1987). Oral drug self-administration: Drugs as reinforcers. In: Bozarth M.A. (Eds.), *Methods of assessing the reinforcing properties of abused drugs* pp. 143-160. New York: Springer-Verlag.
123. Mello, N.K. (2005). Evaluation Of Drug Abuse Treatment Medications: Concordance Between Clinical And Preclinical Studies. *Nida Res. Monogr.* 185: 82–104.

124. Milekic, M.H., Brown, S.D., Castellini, C., *et al.* (2006). Persistent Disruption of an Established Morphine Conditioned Place Preference. *J. Neurosci.*, 26(11), 3010–3020.
125. Mogensen, J., Christensen, L.H., Johansson, A., *et al.* (2002). Place learning in scopolamine treated rats: the roles of distal cues and catecholaminergic mediation. *Neurobiol. Learn. Memory* 78, 139-166.
126. Morris, R.G., Garrud, P., Rawlins, J.N., *et al.* (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297 (5868), 681-683.
127. Mose, V.C., MacPhail, R.C. (1990). Comparative sensitivity of neurobehavioural tests for chemical screening. *Neurotoxicology* 11, 335-344.
128. Moser, P.C., Bergis, O.E., Jegham, S., *et al.* (2002). SL65.0155, A Novel 5-Hydroxytryptamine Receptor Partial Agonist with Potent Cognition-Enhancing Properties. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 302, 731–741.
129. Mucha, R.F., Iversen, S.D. (1984). Reinforcing properties of morphine and naloxone revealed by conditioned place preferences: a procedural examination. *Psychopharmacology*, Vol 82, Number 3, 241-247.
130. Mumby, D.G., Gaskin, S., Glenn, M.J., *et al.* (2002). Hippocampal Damage and Exploratory Preferences in Rats: Memory for Objects, Places, and Contexts. *Learn. Memory* 9, 49-57.
131. NIDA Research Monograph 116 (1991). Drug Discrimination: Applications to Drug Abuse Research.
132. NIDA Research Monograph 20 (1978). Self-Administration of Abused Substances: Methods for Study.
133. NIDA Research Monograph 52 (1984). Testing Drugs for Physical Dependence Potential and Abuse Liability. The Committee on Problems of Drug Dependence.
134. Okuda, S., Roozendaal, B., McGaugh, J.L. (2004). Glucocorticoid effects on object recognition memory require training-associated emotional arousal. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Vol. 101 no. 3, 853–858.
135. Olton, D.S., Samuelson, R.J. (1976). Remembrance of places past: spatial memory in rats. *J. Exp. Psychol.*, 2, 97-116.
136. Overton, D.A. (1971). Discriminative control of behavior by drug states. In: Thompson and Pickens (eds.): Stimulus property of drugs. New York: Appleton-Century Crofts 1971.
137. Pavlov, I.P. (1906). Scientific study of so-called psychical processes of higher animals. *Science*, 24, 613-619.
138. Pavlov, I.P. (1927). Conditioned reflexes: An investigation of the physiological activity of the cerebral cortex. London: Oxford University Press.
139. Pelloux, Y. (2006). Novelty preference predicts place preference conditioning to morphine and its oral consumption in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 84, 43-50.
140. Peng, W.H., Hsieh, M.T., Wu, C.R. (1997). Effect of Long-Term Administration of Berberine on Scopolamine-Induced Amnesia in Rats. *Jpn. J. Pharmacol.*, 74, 261-266.
141. Phillips, A.G., Fibiger, H.C. (1987). Anatomical and neurochemical substrates of drug reward determined by the conditioned place preference technique. In: Bozarth M.A. (Eds.), *Methods of assessing the reinforcing properties of abused drugs*, pp. 275-290.
142. Pickens, R., Harris, W.C. (1968). Self-administration of d-amphetamine by rats. *Psychopharmacology*, 12, 158-163.
143. Pickens, R., Thompson, T. (1968). Cocaine-reinforced behavior in rats: Effects of reinforcement magnitude and fixed-ratio size. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 161, 122-129.
144. Pierce, J.M. (1997). *Animal learning and cognition*. Erlbaum (UK): Psychology Press; 1997.
145. Pitsikas, N., Rigamonti, A.E., Cella, S., *et al.* (2002). The non-NMDA receptor antagonist NBQX does not affect rats performance in the object recognition task. *Pharmacol. Res.*, 45 (1), 43-46.
146. Popik, P., Wrobel, M., Bisaga, A. (2006). Reinstatement of Morphine-Conditioned Reward is Blocked by Memantine. *Neuropsychopharmacology* 31, 160–170.

147. Preston, K.L. (1991). Drug discrimination methods in human drug abuse liability evaluation. *Br. J. Addict.* 86(12), 1587-1594.
148. Raffa, R.B., Tallarida, R.J. (2006). Modified 'Joyce model' of opioid dependence/withdrawal. *Eur. J. Pharmacol.*, 551(1-3), 54-57.
149. Ribeiro Do Couto, B., Aguilar, M.A., Manzanedo, C., *et al.* (2003). Reinstatement of morphine-induced conditioned place preference in mice by priming injections. *Neural. Plast.*, 10(4), 279-290.
150. Richelle, M. (1966). *Le conditionnement opérant*, Neuchatel, Paris: Delachaux et Niestlé, pp. 1-221.
151. Rilling, M. (1968). Effects of timeout on a discrimination between fixed-ratio schedules. *J. Exp. Anal. Behav.* 11, 129-132.
152. Risner, M.E., Jones, B.E. (1975). Self-administration of CNS stimulants by dog. *Psychopharmacologia*, 43, 207-213.
153. Risner, M.E., Jones, B.E. (1976). Characteristics of unlimited access to self-administered stimulant infusions in dogs. *Biol. Psychiatry*, 11, 625-634.
154. Risner, M.E., Silcox, D.L. (1979). Mazindol self-administration by dog. Presented at the American Psychological Association Annual Meeting, New York.
155. Roberts, D.S.C., Phelan, R. Gender Differences in Cocaine Self-administration in rats. Relevance to human drug taking behaviour. Drug addiction research and the health of women. Wetherington, C.L., Roman, A.B. (Eds.), NIH publication N° 98-4289. Disponible sur [http://www.nida.nih.gov/PDF/DARHW/165-172\\_Roberts.pdf](http://www.nida.nih.gov/PDF/DARHW/165-172_Roberts.pdf).
156. Rogowski, A., Rokicki, D., Kostowski, W. (2003). Relationship between dopamine d2 receptor-associated responses and operant ethanol self-administration in the rat: a factor analysis. *Alcohol Alcoholism* 4, 305-309.
157. Rohmer, J.G. (2002). Toxicomanie aux Stupéfiants : Épidémiologie, Modalités de prise en charge, Complications, Diagnostic et Traitement des surdoses ; Manifestations cliniques du syndrome de sevrage. Faculté de Médecine ULP Strasbourg. Année 2002.
158. Ronnback, L., Eriksson, P.S., Zeuchner, J. (1987). Aspects of abstinence after morphine ingestion. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 28 (1): 87-93.
159. Rousseau, P. (2005). Mise au point et validation d'un test d'évaluation des fonctions cognitives chez le rat : le labyrinthe aquatique de Cincinnati. Mémoire de stage de Master 2 Professionnel.
160. Rowlett, J.K. (1999). Reinforcing and discriminative stimulus effects of the neuroactive steroids pregnanolone and Co 8-7071 in rhesus monkeys. *Psychopharmacology (Berl)*. 145(2):205-212.
161. Saelens, J.K., Granat, F.R., Sawyer, W.K. (1971). The mouse-jumping test, a simple screening method to estimate the physical dependence capacity of analgesics. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, 190(2), 213-218.
162. Sahraei, H., Ghazzaghi, H., Zarrindast, M.R. (2004). The role of alpha-adrenoceptor mechanism(s) in morphine-induced conditioned place preference in female mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 78 : 135-141.
163. Schuster, C.R., Balster, R.L. (1977). The discriminative stimulus properties of drugs. In: Thompson, T., Dews, P.B. (eds), *Adv. Behav. Pharmacol.*, Vol 1. Academic Press, New York, pp 85-138.
164. Schuster, C.R., Johanson, C.E. (1988). Relationship between the discriminative stimulus properties and subjective effects of drugs. *Psychopharmacol. Ser.*, 4, 161-175.
165. Shannon, H.E., Holtzman, S.G. (1976). Evaluation of the discriminative effects of morphine in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 198, 54-65.
166. Shettleworth, S.J. (1995). Comparative studies of memory in food storing birds. In: Alleva, E., Fasolo, A., Lipp, H.P., *et al.* (Eds.). *Behavioural brain research in naturalistic and semi-naturalistic settings*. Dordrecht Kluwer, p. 159-192.

167. Shoaib, M., Stolerman, I.P., Kumar, R.C. (1994). Nicotine-induced place preferences following prior nicotine exposure in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 113(3-4), 445-452.
168. Skinner, B.F. (1938). *The Behavior of Organisms*. New York, Appleton-Century.
169. Skinner, B.F. (1968). *The Technology of Teaching*, New York, Appleton-Century.
170. Slikker, Jr. W., Beck, B.D., Cory-Slechta, D.A., *et al.* (2000). Cognitive Tests: Interpretation for Neurotoxicity? (Workshop Summary). *Toxicol. Sci.*, 58, 222-234.
171. Solinas, M., Panlilio, L.V., Goldberg, S.R. (2004). Exposure to D-9-Tetrahydrocannabinol (THC) Increases Subsequent Heroin Taking but not Heroin's Reinforcing Efficacy: A Self-Administration Study in Rats. *Neuropsychopharmacol.* 29, 1301-1311.
172. Solinas, M., Panlilio, L.V., Justinova, Z., *et al.* (2006). Using drug-discrimination techniques to study the abuse-related effects of psychoactive drugs in rats. *Nature Protocols*, 1, 1194-1206.
173. Spyraki, C., Kazandjian, A., Varonos, D. (1985). Diazepam-induced place preference conditioning: appetitive and antiaversive properties. *Psychopharmacology (Berl)*., 87(2), 225-232.
174. Stewart, J., de Wit, H. (1987). Reinstatement of drug-taking behavior as a method of assessing incentive motivational properties of drugs. In: Bozarth M.A. (Eds.), *Methods of assessing the reinforcing properties of abused drugs*, pp. 211-227.
175. Stretch, R., Gerber, G.J. (1970). A method for chronic intravenous drug administration in squirrel monkeys. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 48, 575-581.
176. Tao, P.L., Liang, K.W., Sung, W.Y., *et al.* (2006). Nalbuphine is effective in decreasing the rewarding effect induced by morphine in rats. *Drug Alcohol Depend.*, 84, 175-181.
177. Thompson, T., Schuster, C.R. (1964). Morphine self-administration, food reinforced, and avoidance behaviors in rhesus monkey. *Psychopharmacologia*, 5, 87-94.
178. Trang, T., Sutak, M., Quirion, R., *et al.* (2003). Spinal administration of lipoxygenase inhibitors suppresses behavioural and neurochemical manifestations of naloxone-precipitated opioid withdrawal. *Br. J. Pharmacol.*, 140, 295-304.
179. Tzschentke, T. (1998). Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. *Prog. Neurobiol.*, 56:613-672.
180. Van der Kooy, D. (1987). Place conditioning: A simple and effective method for assessing the motivational properties of drugs. In: Bozarth M.A. (Eds.), *Methods of assessing the reinforcing properties of abused drugs* pp. 229-240.
181. Van der Laan, J.W. (1991). Validation of spontaneous morphine withdrawal symptoms in rats. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 311, 32-45.
182. Van der Laan, J.W., de Groot, G. (1988). Changes in locomotor-activity patterns as a measure of spontaneous morphine withdrawal: no effect of clonidine. *Drug Alcohol. Depend.* 22(1-2), 133-140.
183. Vorhees, C.V., Williams, M.T. (2006). Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat. Protoc.* 1(2), 848-858.
184. Walker, E.A., 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.
185. Walker, E.A., Young, A.M. (2002). Cloccinamox distinguishes opioid agonists according to relative efficacy in normal and morphine-treated rats trained to discriminate morphine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302, 101-110.
186. Wang, D., Raehal, K.M., Bilsky, E.J. (2001). Inverse agonists and neutral antagonists at mu-opioid receptor (MOR): possible role of basal receptor signaling in narcotic dependence. *J. Neurochem.*, 77, 1590-1600.
187. Wang, D., Raehal, K.M., Lin, E.T., *et al.* (2004). Basal Signaling Activity of mu-opioid Receptor in Mouse Brain: Role in Narcotic Dependence. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 308, 512-520.
188. Waters, W.H., Richards, D.W., Harris, R.T. (1972). Discriminative control and generalization of the stimulus properties of d-amphetamine in the rat. In: *Drug addiction. Vol. I: Experimental*

- pharmacology, Singh, J.M., Miller, L., Lal, H. (eds.), pp. 87–98. Mt. Kisco, N.Y.: Futura Publ. 1972.
189. Weeks, J.R. (1962). Experimental morphine addiction: Method for automatic intravenous injections in unrestrained rats. *Science*, 138, 143-144.
  190. Weeks, J.R., Collins, R.J. (1964). Factors affecting voluntary morphine intake in self-maintained addicted rats. *Psychopharmacologia*, 6, 267-279.
  191. Weeks, J.R., Collins, R.J. (1987). Screening for drug reinforcement using intravenous self-administration in the rat. In: Bozarth M.A. (Eds.), *Methods of assessing the reinforcing properties of abused drugs*, pp. 35-43.
  192. Whishaw, I.Q. (1995). A comparison of rats and mice in a swimming pool place task and matching to place task: some surprising differences. *Physiol. Behav.*, 58, 687-693.
  193. Whishaw, I.Q., Tomie, J.A. (1996). Of mice and mazes: similarities between mice and rats on dry land but not water mazes. *Physiol. Behav.*, 60, 1191-1197.
  194. Wilmouth, C.E., Spear, L.P. (2006). Withdrawal From Chronic Nicotine In Adolescent And Adult Rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 85(3), 648–657.
  195. Winger, G.D., Woods, J.H. (1973). The reinforcing property of ethanol in the rhesus monkey: I. Initiation, maintenance and termination of intravenous ethanol-reinforced responding. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 215, 162-175.
  196. Winters, B.D., Saksida, L.M., Bussey, T.J. (2006). Paradoxical Facilitation of Object Recognition Memory after Infusion of Scopolamine into Perirhinal Cortex: Implications for Cholinergic System Function. *J. Neurosci.*, 26(37), 9520 –9529.
  197. Wolfer, D.P., Stagljär-Bozicevic, M., Errington, M.L., *et al.* (1998). Spatial memory and learning in transgenic mice: fact or artifact?. *News Physiol. Sci.*, 13, 118-123.
  198. Woods, J.H., Young, A.M., Herling, S. (1982). Classification of narcotics on the basis of their reinforcing, discriminative, and antagonist effects in rhesus monkeys. *Fed. Proc.*, 41, 221-227.
  199. Yanagita, T., Takahashi, S. (1970). Development of tolerance to and physical dependence on barbiturates in rhesus monkeys. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 172, 163-169.
  200. Yokel, R.A. (1987). Intravenous self-administration: Response rates, the effects of pharmacological challenges, and drug preference. In: Bozarth, M.A. (Eds.), *Methods of assessing the reinforcing properties of abused drugs*, pp. 1-33. New York: Springer-Verlag.
  201. Yokel, R.A., Pickens, R. (1973). Self-administration of optical isomers of amphetamine and methylamphetamine by rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 187, 27-33.
  202. Zarcone, T.J., Ator, N.A. (2000). Drug discrimination: stimulus control during repeated testing in extinction. *J. Exp. Anal. Behav.* 74, 283–294.
  203. Zhang, Z., Schulteis, G. (2008). Withdrawal from acute morphine dependence is accompanied by increased anxiety-like behavior in the elevated plus maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 89(3), 392-403.
  204. Zhou, L., Zhu, Y. (2006). Changes of CREB in rat hippocampus, prefrontal cortex and nucleus accumbens during three phases of morphine induced conditioned place preference in rats. *J. Zhejiang Univ., Science B*, 7(2), 107-113.
  205. Zhu, Y., Long, Z., Zheng, M. (2006). Effect of glycine site/NMDA receptor antagonist MRZ2/576 on the conditioned place preference and locomotor activity induced by morphine in mice. *J. Zhejiang Univ., Science B*, 7(12), 998-1005.

## Sitographie

- S1. Alamargot D. - L'acquisition des connaissances. - In C. Golder & D. Gaonac'h (Eds.). Enseigner à des adolescents. Manuel de Psychologie. (2001) Coll. Profession Enseignant. Hachette Education. pp. 78-113. page consultée le 20 mai 2008. [http://www.mshs.univ-poitiers.fr/lmdc/pagespersos/alamargot/Alamargot\\_acquisition.pdf](http://www.mshs.univ-poitiers.fr/lmdc/pagespersos/alamargot/Alamargot_acquisition.pdf)
- S2. Buclin Th. Pharmacodynamie de l'abus de substances. Revue Médicale Suisse N°635 publiée le 24/10/2001. Page consultée en ligne le 20 juin 2008 sur <http://titan.medhyg.ch/mh/formation/article.php3?sid=21696>.
- S3. <http://abdellab.sunderland.ac.uk/Lectures/Neuropharmacology/Glutamate3.html> Page consulté en ligne le 20 mai 2008.
- S4. <http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?id=4226>. Page consultée en ligne le 18 février 2009.
- S5. [http://lecerveau.mcgill.ca/flash/index\\_d.html](http://lecerveau.mcgill.ca/flash/index_d.html) Page consultée en ligne le 05 mai 2008.
- S6. <http://univr-cms.u-strasbg.fr/pages.jsp?idTheme=756&idsite=142&idRub=407&rubSel=407>
- S7. <http://ute.umh.ac.be/dutice/uv6a/module6a-1.htm> Page consultée en ligne le 20 mai 2008.
- S8. <http://www.australianprescriber.com/magazine/19/3/76/8/> Page consultée en ligne le 18 février 2009.
- S9. <http://www.bris.ac.uk/synaptic/info/glutamate.html> Page consultée en ligne le 20 mai 2008.
- S10. <http://www.csrq.qc.ca/MitchellMontcalm/proj/NEUROMOD/3.htm> Page consultée en ligne le 20 mai 2008.
- S11. [http://www.geocities.com/boss\\_be\\_99/les\\_reflexes\\_conditionnels.htm](http://www.geocities.com/boss_be_99/les_reflexes_conditionnels.htm)
- S12. <http://www.inrp.fr/Access/biotic/neuro/plasticite/html/potentialisation.htm> Page consultée en ligne le 20 mai 2008.
- S13. <http://www.lib.mcg.edu/edu/eshuphysio/program/section8/8ch11/pg16fig0.htm> Page consultée en ligne le 20 mai 2008.
- S14. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=frbehav&part=ch3>
- S15. <http://www.vetopsy.fr/comp/mem/mem.php>
- S16. Louis, C. cours : « Conditionnement de Pavlov – Conditionnement de Skinner ». [http://www.kb.u-psud.fr/formation-continue/du-tabacologie/cours/11\\_Louis\\_Skinner\\_Pavlov\\_08.pdf](http://www.kb.u-psud.fr/formation-continue/du-tabacologie/cours/11_Louis_Skinner_Pavlov_08.pdf).
- S17. Morris Water Maze Protocol: [psych.colorado.edu/~dbarth/PDFs/4052/4052%20Manual%20Chapters/Morris%20Water%20Maze.pdf](http://psych.colorado.edu/~dbarth/PDFs/4052/4052%20Manual%20Chapters/Morris%20Water%20Maze.pdf) consulté le 06 juillet 2008
- S18. Stinus Luis, Cador Martine Pharmacologie et dépendance aux drogues, de la molécule au comportement sur <http://formation.tabacologie.globalink.org/stinus2000/cours.htm> Page consultée en ligne le 22 mai 2008.





## **VI ANNEXE**

Poster présenté à la SPS (safety pharmacology society) 7<sup>ème</sup> meeting annuel à Edimbourg, Ecosse, le 19-21 Septembre 2007 : « Evaluation of cognitive functions: comparison of three methods ».

# EVALUATION OF COGNITIVE FUNCTIONS: COMPARISON OF THREE METHODS

Antoine Lodirot, Pauline Rousseau, Guillaume Froget, Pierre Lainée and Roy Forster

CIT, Evreux, France



## Introduction

Cognitive functions must be investigated as part of various regulatory preclinical safety studies, including reproductive toxicity, developmental neurotoxicity and juvenile toxicity studies. For this purpose several types of test are commonly used, such as conditioning paradigms, mazes (including water mazes) and object recognition tasks. In the work presented here we have evaluated the effects of the same pharmacological agent, scopolamine (administered intraperitoneally at 3 mg/kg) using three different testing approaches to assess cognitive abilities: Cincinnati Water Maze, Morris Water Maze and Object Recognition Task. The first two methods test cognitive ability under aversive conditions, while the third method is based on the natural exploratory behaviour of rats.

## Object Recognition Task

The Object Recognition Task is a simple memory evaluation method based on the natural exploratory behaviour of rats. The time taken to explore a new object is measured after treatment with the reference compound or vehicle

### Materials and methods

A training phase ( $T_0$ ) was performed 30 min after administration of scopolamine (3 mg/kg i.p.), in which Sprague Dawley rats (4 animals/group/sex) were placed in the open field with two identical objects (7x7x5 cm wooden cubes) for 180 seconds. The test phase ( $T_2$ ) was realized two hours after the training phase. Rats were placed again in the open field and presented with a novel object (a 10 cm diameter plastic truck wheel) together with one familiar object (wooden cube). A second test phase was performed 24 hours later ( $T_{24}$ ) with a ceramic cylinder (8 cm high x 6.5 cm diameter). The time spent exploring each object was manually recorded, and an Exploratory Index (EI) and a Discrimination Index (DI) were calculated:  $T_A$ : time spent on object A (familiar)  $T_B$ : time spent on object B (novel)  $EI = T_B + T_A$   $DI = [(T_B - T_A) / (T_B + T_A)] \times 100$  EI represents the total amount of time spent to explore both objects. DI represents the additional time the animal spends on the exploration of the new object compared to the familiar object. e.g., if an animal spend the same time on both objects, DI would be equal to 0%.

Exploration of an object is defined as "directing the nose to the object at a distance of  $\leq 2$  cm and/or touching it with the nose. Turning around or sitting on an object is not considered as exploration." (Ennaceur and Delacour 1988)

### Results (Fig.1-Table1)

In the training phase, the time taken to explore the two identical objects was similar in control and scopolamine treated rats. During the test phase 2 hours after drug administration, scopolamine-treated rats showed a significant decrease of DI (90% compared to control rats) indicating that scopolamine treated rats consider the familiar object as a new one. In control treated rats like in scopolamine treated rats, DI at T24 are getting nearer to 0%, suggesting a memory retention time of less than 24h in our experimental conditions. A sex difference was observed in these results, and control female rats showed a lower DI compared to control male rats.



Fig. 1: Object recognition task validation

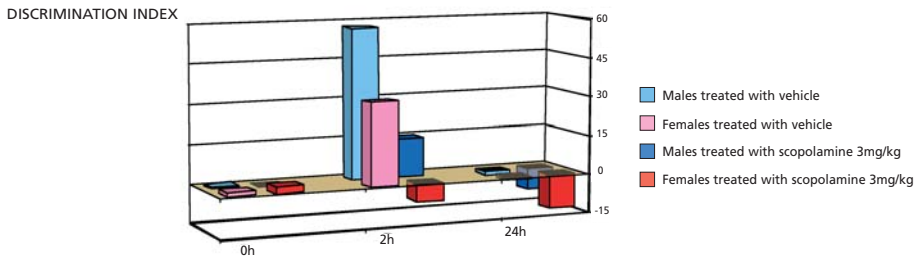


Table:  $p < 0,05$  vs. vehicle group

|                            |           | Males          |                   | Females        |                  |
|----------------------------|-----------|----------------|-------------------|----------------|------------------|
|                            |           | Vehicle        | Scopolamine       | Vehicle        | Scopolamine      |
| Training phase<br>$T_0$    | $T_A$ (s) | 12,8 $\pm$ 0,5 | 12,3 $\pm$ 1,4    | 19,3 $\pm$ 0,9 | 24,0 $\pm$ 2,5   |
|                            | $T_B$ (s) | 13,5 $\pm$ 1,3 | 11,8 $\pm$ 1,1    | 20,0 $\pm$ 1,2 | 24,3 $\pm$ 1,2   |
|                            | EI (s)    | 26,3 $\pm$ 1,7 | 24,0 $\pm$ 2,4    | 39,3 $\pm$ 1,7 | 48,3 $\pm$ 3,5   |
|                            | DI (%)    | 0,8 $\pm$ 6,5  | -0,4 $\pm$ 0,7    | 1,7 $\pm$ 6,5  | 2,6 $\pm$ 7,3    |
| Test phase 2h<br>$T_2$     | $T_A$ (s) | 4,5 $\pm$ 0,5  | 9,3 $\pm$ 1,0     | 12,0 $\pm$ 0,7 | 22,8 $\pm$ 1,1   |
|                            | $T_B$ (s) | 16,5 $\pm$ 1,1 | 21,5 $\pm$ 1,1    | 23,8 $\pm$ 1,7 | 20,8 $\pm$ 2,0   |
|                            | EI (s)    | 21,0 $\pm$ 1,5 | 21,8 $\pm$ 1,5    | 35,8 $\pm$ 2,1 | 43,5 $\pm$ 2,6   |
|                            | DI (%)    | 58,0 $\pm$ 3,8 | 15,0 $\pm$ 10,5 * | 31,7 $\pm$ 7,8 | -6,7 $\pm$ 8,5 * |
| Test phase 24h<br>$T_{24}$ | $T_A$ (s) | 10,5 $\pm$ 1,3 | 15,3 $\pm$ 1,6    | 15,3 $\pm$ 0,7 | 20,8 $\pm$ 1,2   |
|                            | $T_B$ (s) | 9,8 $\pm$ 0,9  | 13,0 $\pm$ 1,5    | 15,0 $\pm$ 0,7 | 16,0 $\pm$ 1,0   |
|                            | EI (s)    | 20,3 $\pm$ 2,2 | 28,3 $\pm$ 3,2    | 30,3 $\pm$ 1,0 | 36,8 $\pm$ 2,0   |
|                            | DI (%)    | -1,7 $\pm$ 3,5 | -8,5 $\pm$ 0,8    | -0,9 $\pm$ 6,5 | -12,9 $\pm$ 3,5  |

## Morris Water Maze

The Morris Water Maze is a spatial navigation task for measuring learning and memory in rodents. Using visual cues, rats learn to find the hidden platform and to escape from the water during repeated daily sessions.

### Materials and methods

This test was performed in a circular pool (diameter: 2 m and depth: 50 cm) filled to a water depth of 25 cm. The water was maintained at a temperature of around  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ . The animals were put into the water from one of the four starting points (N, S, E, W). The exit point consisted of a transparent circular platform (10 cm) placed underwater at a fixed location in the pool.

20 minutes prior to the first test of each day, Sprague Dawley rats (5 animals/groups/sex) were administered scopolamine (3 mg/kg i.p.) or vehicle (0.9% saline). Rats were tested four times per day (at different starting points) for four consecutive days. They were allowed up to a maximum of 180 seconds to reach the platform. In the case of failure,

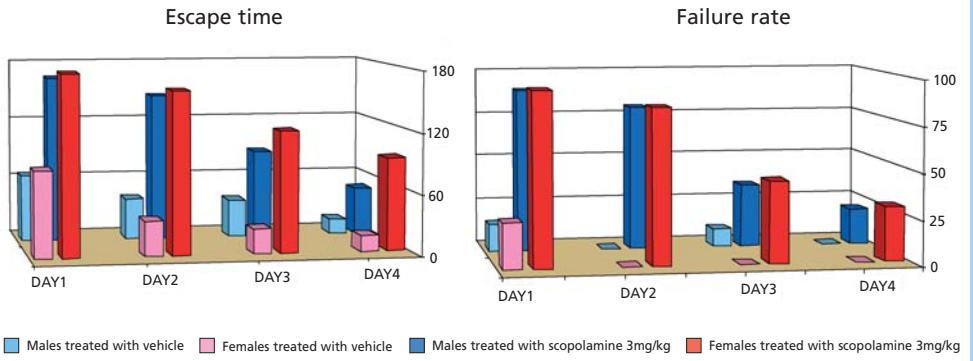


the rat was gently pushed towards the escape platform and a negative score was recorded. Swimming time to reach the platform was measured. The animal movement in the maze was recorded both manually and by videotracking (Flir System Thermovision A20V video camera). Different parameters, such as time to escape and time spent in each quarter of the pool during the trials, were analysed by data acquisition software (IRTrack 1.0.5, Intellibio, Nancy, France).

### Results (Fig.2)

Scopolamine-treated rats had longer swimming times when compared to controls, and the number of failures increased significantly each day. The difference in memory performance (time to reach platform and failure rate) between males and females increased from day 1 to day 4. Female rats appeared to be more sensitive to scopolamine than the males.

Fig. 2: Morris water maze validation



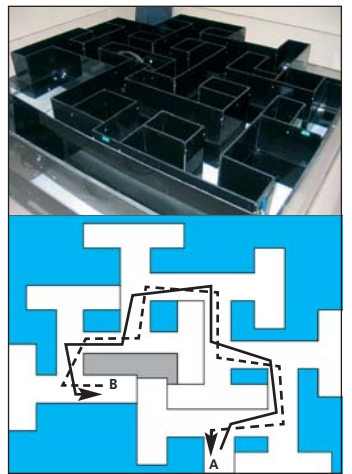
## Cincinnati Water Maze

The Cincinnati Water Maze (Multiple T maze) is a spatial navigation task that measures learning and memory in rodents. Unlike the Morris Water Maze, this more complex maze is a multiple choice task that requires a sequential learning.

### Materials and methods

The Cincinnati maze design consists of nine interlinked T-units (each measuring 15 cm in stem length and 22 cm in the cul-de-sac arms) submerged in a pool filled to a water depth of 25 cm. The most direct path leading from the start (point A) to the exit platform (point B), laid 1 cm under the water, requires three right and six left turns (asymmetrically linked). The water temperature is maintained at  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ .

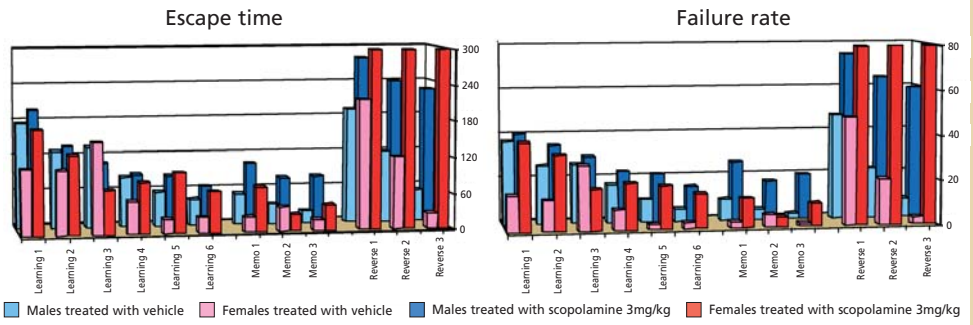
20 minutes prior to each test, Sprague Dawley rats (5 animals/group/sex) were administered scopolamine (3 mg/kg i.p.) or vehicle (0.9% saline). Six training phases are performed to evaluate learning ability. Memorization and adaptation to environmental changes are evaluated during three memory phases and three reverse phases. In the case of failure, the rat was gently pushed towards the escape platform and a negative score was recorded. Each animal's movements in the maze were recorded both manually and by videotracking (Flir System). Different parameters, such as time to escape and time spent in each quarter of the pool during the trials, were analysed by data acquisition software (IRTrack 1.0.5, Intellibio, Nancy, France).



### Results (Fig.3)

The administration of scopolamine did not significantly affect performance during the learning trials and memorization phase when compared to controls. During the reverse phase, scopolamine-treated rats showed significantly increased mean swimming times and failure rates when compared to control rats. Female rats showed a higher time to escape than the males. A decrease in the number of errors was seen in male rats during the reverse phase, but not in the females.

Fig. 3: Cincinnati water maze validation



## Conclusion and discussion

We have evaluated the effects of the same pharmacological agent, scopolamine (administered intraperitoneally at 3 mg/kg) using three different testing approaches to assess cognitive abilities: Cincinnati Water Maze, Morris Water Maze and Object Recognition Task.

In the Object Recognition Task, at 2 hours after the training phase, scopolamine treated rats showed reduced DI, showing that they do not recognize the training object as a familiar one.

In the Morris Water Maze, the improvement in escape time measured during the learning phase (day 1 to day 4) was reduced by scopolamine (60% vs. 80% in controls on Day 4).

In the Cincinnati Water Maze, scopolamine induced no significant modifications during the learning and memorization phases, but adaptation to environmental changes during reverse phase was significantly reduced (2 to 4 fold increase in the failure rate).

In all three tests, a sex difference was noted and females showing a greater sensitivity to the action of scopolamine than males. The vehicle treated female performances of females were also lower than in males. The designs of these studies do not allow to determine whether the pharmacokinetics and/or the repeated administration of scopolamine might have a significant influence on the results.

## References

- Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res.* 1988 Nov 1; 31(1):47-59
- Vorhees CV. Maze learning in rats: comparison of performance in two water mazes in progeny prenatally exposed to different doses of phenytoin. *Neurotoxicology and teratology.* 1987; 9:235-241
- Morris RGM. Development of a water maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J neuro science methods* 1984 11: 47-60

